

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BIOMASSA DE CACAU**

FLAVIANE MENDONÇA AMBROZIM

ALEGRE, ES

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BIOMASSA DE CACAU**

FLAVIANE MENDONÇA AMBROZIM

ALEGRE, ES

2019

Flaviane Mendonça Ambrozim

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BIOMASSA DE CACAU**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Linha de Pesquisa: Materiais, Bioprocessos e Meio Ambiente

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Iara Rebouças Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Betencurte da Silva

ALEGRE, ES

FEVEREIRO/ 2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A495e Ambrozim, Flaviane Mendonça, 1991-
Estudo das condições de fermentação em estado sólido para
produção de celulasas utilizando biomassa de cacau / Flaviane
Mendonça Ambrozim. - 2019.
63 f. : il.

Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro.
Coorientador: Wellington Betencurte da Silva.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Engenharia Química. 2. Fermentação. 3. Enzimas de
fungos. I. Pinheiro, Iara Rebouças. II. Silva, Wellington
Betencurte da. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 66.0

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BIOMASSA DE CACAU**

Flaviane Mendonça Ambrozim

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Engenharia
Química do Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias da Universidade Federal do
Espírito Santo, como parte das exigências
para obtenção do Título de Mestre em
Engenharia Química.

Examinado em 25 de fevereiro de 2019.



Prof.^a Dr.^a: Iara Rebouças Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.^a Dr.^a: Audrei Giménez Barañano
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.^a Dr.^a: Laura Marina Pinotti
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.^a Dr.^a: Jussara Moreira Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo

DEDICATÓRIA

À minha família, que está sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e pelas bênçãos recebidas todos os dias.

À Iara por sua orientação, pela paciência, amizade e carinho, por todos os ensinamentos proporcionados e pela disponibilidade em todos os momentos.

Ao meu coorientador Wellington e ao Julio pelas inúmeras sugestões e paciência.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de contribuírem com o meu trabalho.

Aos meus pais, Cosme e Marilza, e minha irmã Fabiana pelo amor incondicional, apoio, conselhos e por nunca medirem esforços em ajudarem a realizar os meus sonhos. Amo vocês.

Ao meu noivo João Vitor por seu amor, carinho e compreensão; por sua cumplicidade e apoio em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado nas batalhas da vida. Amo você.

Às amigas: Ana Júlia, Rayane, Rhynara, Rhuany, Thaís e Talita pelos momentos de alegria e conselhos.

Aos colegas de laboratório Iauãni, Renan, Viviane e Carol pelas parcerias e trocas de conhecimentos; e à Isabela por sua colaboração durante alguns experimentos.

Aos colegas de trabalho Arlan, Davi, Elzi, Gustavo, Pedro e Soninha, pelos conselhos e pela amizade.

Aos laboratórios de Bromatologia e Microbiologia de Alimentos e aos demais técnicos de laboratório pelo auxílio em procedimentos e materiais necessários para o desenvolvimento dos experimentos.

A Agroindústria Chocolates Espírito Santo, a Usina Paineiras e a Fundação Osvaldo Cruz pela colaboração em ceder materiais para os experimentos.

Muito obrigada.

RESUMO

AMBROZIM, Flaviane Mendonça. **Estudo das Condições de Fermentação em Estado Sólido para Produção de Celulases Utilizando Biomassa de Cacau.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientadora: Iara Rebouças Pinheiro. Coorientador: Wellington Betencurte da Silva.

As celulases são enzimas empregadas em diversos segmentos da indústria, e dentre suas aplicações destaca-se a produção de biocombustíveis a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, oriundos de resíduos agroindustriais (cascas de cacau, café, coco, e outros). Contudo, o maior obstáculo para a expansão e comercialização dessa produção corresponde ao alto valor do custo de produção das celulases. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições de fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* para a produção de celulases aplicando biomassa de cacau como substrato. Cultivos em frascos erlenmeyer foram realizados para avaliar a influência do teor de umidade, na faixa entre 50 e 70%, e da proporção de casca de cacau (CC), na faixa entre 40 e 60%, aplicando um planejamento experimental 3^2 , tendo como variável de resposta a atividade enzimática FPase. A influência da aeração na produção das enzimas foi avaliada, em cultivos com farelo de trigo e bagaço de cana, a partir da medida da atividade enzimática FPase nos cultivos em colunas Raimbault com aeração forçada, comparando com cultivos estáticos sob mesmas condições. Obteve-se atividade enzimática FPase máxima de 1,85 U/gms com 60% de CC e 70% de umidade em 120 horas de cultivo em frascos, para os quais a umidade foi o fator que causou o maior efeito. Nas fermentações em colunas, a atividade FPase alcançou 5,40 U/gms contra 3,50 U/gms na fermentação estática, correspondendo a um aumento de 51,3%. Portanto, a CC se mostrou promissora como substrato para produção de celulases por FES e a aeração forçada possibilitou a obtenção de atividades enzimáticas maiores, confirmando assim sua forte influência em processos de FES.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, reaproveitamento de resíduos, colunas de Raimbault, planejamento experimental.

ABSTRACT

AMBROZIM, Flaviane Mendonça. **Study of Solid State Fermentation Conditions for Cellulase Production Using Cocoa Biomass**. 2019. Dissertation. (Master degree in Chemical Engineering) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Iara Rebouças Pinheiro. Co-adviser: Wellington Betencurte da Silva.

The cellulases are enzymes used in several segments of the industry, and among its applications the production of biofuels using the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, from agroindustrial residues (cocoa, coffee, orange, and others peels) is noteworthy. However, the major obstacle to the expansion and commercialization of this production corresponds to the high cost of cellulases production. In this context, the aim of this work was to study the solid state fermentation conditions using the filamentous fungus *Trichoderma harzianum* for cellulases production and applying cocoa biomass as substrate. Cultures in erlenmeyer flasks were carried out to evaluate the influence of moisture content, in the range of 50 to 70%, and of the proportion of cocoa peel (CP), in the range of 40 to 60%, applying an experimental design 3^2 , being the enzymatic activity response variable. The influence of aeration, using wheat bran and sugarcane bagasse, on enzyme production was evaluated by measuring the FPase enzymatic activity in Raimbault columns with forced aeration, comparing with static cultures under the same conditions. A maximum FPase enzyme activity of 1.85 U/gds was obtained with 60% CP and 70% of moisture in 120 hours of culture in flasks, for which moisture was the factor that caused the greatest effect. In the column fermentations, FPase activity reached 5.40 U/gds against 3.50 U/gds in the static fermentation, corresponding to an increase of 51.3%. Therefore, CC proved to be promising as a substrate for FES cellulase production and forced aeration made it possible to obtain larger enzymatic activities, thus confirming its strong influence on FES processes.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, reuse of waste, Raimbault columns, experimental design.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – sulfato de amônio;

β_0 – média de todas as respostas do planejamento experimental;

β_1, β_2 – coeficientes dos efeitos individuais lineares dos fatores do planejamento experimental;

β_{12} – coeficientes do efeito de interação linear entre os fatores do planejamento experimental;

β_{11}, β_{22} – coeficientes dos efeitos individuais quadráticos dos fatores do planejamento experimental;

β_{1122} – coeficientes do efeito de interação quadráticos entre os fatores do planejamento experimental;

μL – microlitros;

a_w – atividade de água;

BC – bagaço de cana-de-açúcar;

BG – β -glicosidases;

CBH – celobiohidrolases;

CC – casca de cacau;

CMC – carboximetilcelulose;

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – cloreto de cobalto hexa-hidratado;

C_{susp} – concentração de esporos da suspensão;

D_a – fator de diluição;

EC – Comissão de enzima;

EnG – endoglicanases;

ExG – exoglicanases;

FES – fermentação em estado sólido;

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – sulfato ferroso hepta-hidratado;

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz;

FP – filter paper;

FS – fermentação submersa;

FT – farelo de trigo;

g/L – gramas por litro;

GH – glicano-hidrolases;

gms – gramas de massa seca;

IU – unidade internacional;

KH_2PO_4 – fosfato de potássio monobásico;

M – massa total de meio fermentativo;

m_{final} – massa da amostra seca;

mg/L – miligramas por litro;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – sulfato de magnésio hepta-hidratado;

$m_{inicial}$ – massa da amostra úmida;

MnSO_4 – sulfato de manganês;

m_{ss} – massa de solução salina;

N – número médio de esporos nos campos medidos;

NaCl – cloreto de sódio;

NaOH – hidróxido de sódio;

°C – graus Celcius;

PDA – potato-dextrose-ágar;

U – teor de umidade (%);

U – unidade de atividade enzimática;

V_{campo} – volume de cada campo;

V_{ss} – volume de solução salina;

x_1 – umidade codificada;

x_2 – concentração de casca de cacau codificada;

Y – variável de resposta para atividade FPase;

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – sulfato de zinco hepta-hidratado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das estruturas químicas da (a) celobiose, da (b) molécula de celulose e das (c) ligações de hidrogênio intra e inter cadeias.	22
Figura 2 – Esquema da conversão de biomassa em biocombustíveis.	23
Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico.	25
Figura 4 – Esquema de uma coluna de Raimbault.	34
Figura 5 – Etapas da preparação da casca de cacau.	41
Figura 6 – Etapas da preparação da casca de cacau.	42
Figura 7 – Etapas da preparação dos estoques de esporos.	43
Figura 8 – Esquema dos campos de contagem de esporos na câmara de Neubauer.	45
Figura 9 – Esquema do processo de extração de enzimas.	49
Figura 10 – Esquema das etapas da determinação da atividade enzimática FPase.	51
Figura 11 – Esquema do sistema de colunas de Raimbault.	53
Figura 12 – Matéria-prima utilizada nos cultivos em estado sólido para a produção de celulasas: (a) casca de cacau e (b) bagaço de cana-de-açúcar.	55
Figura 13 – Cultivos das linhagens (a) <i>T. harzianum</i> IOC-4127 e (b) <i>T. harzianum</i> IOC-3844 em placa de Petri, com meio PDA e o estoque em frasco, com FT e BC.	55
Figura 14 – Cinética da atividade enzimática FPase para <i>T. harzianum</i> IOC-4127 (cinza) e <i>T. harzianum</i> IOC-3844 (preto) com 40% de CC e 60% de umidade inicial.	57
Figura 15 – Efeitos dos fatores na atividade enzimática FPase.	61
Figura 16 – Superfície de resposta para a interação do teor de umidade (x_1) e composição de casca de cacau (x_2) no meio sólido.	63
Figura 17 – Curva de nível para a interação do teor de umidade (x_1) e composição de casca de cacau (x_2) no meio sólido.	63
Figura 18 – Atividade enzimática FPase para cultivos com <i>T. harzianum</i> IOC-4127 nas condições de 60:40 (CC:BC) e (●) 70%, (■) 75% e (▲) 80% de umidade inicial.	67
Figura 19 – Sistema utilizado para a fermentação em colunas de Raimbault.	68
Figura 20 – Destaque para as colunas submersas no banho termostático utilizado para manutenção da temperatura.	69

Figura 21 – Crescimento microbiano para os cultivos de <i>T. harzianum</i> IOC-4127 em colunas após 24, 48, e 120 horas de fermentação.....	70
Figura 22 – Crescimento microbiano para os cultivos de <i>T. harzianum</i> IOC-4127 em frascos após 24, 48 e 120 horas de fermentação.	70
Figura 23 – Comparação da atividade enzimática FPase em cultivos sólidos com <i>T. harzianum</i> IOC-4127 em frascos (■) e em colunas de Raimbault.(●).	71
Figura 24 – Crescimento microbiano para os cultivos de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 em colunas após 24, 48 e 120 horas de fermentação.....	72
Figura 25 – Crescimento microbiano para os cultivos de <i>T. harzianum</i> IOC-3844 em frascos após 24, 48 e 120 horas de fermentação.	72
Figura 26 – Comparação da atividade enzimática FPase em cultivos sólidos com <i>T. harzianum</i> IOC-3844 em frascos (■) e nas colunas de Raimbault.(●).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos produtores de celulasas empregando diferentes substratos e condições de cultivo e seus respectivos resultados.	29
Tabela 2 – Valores aproximados de alguns componentes físicos do cacau maduro.	36
Tabela 3 – Composição química da casca do cacau.	37
Tabela 4 – Composição da solução salina utilizada para umidificação do meio sólido.	43
Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento experimental para a fermentação....	46
Tabela 6 – Planejamento experimental para a fermentação.	47
Tabela 7 – Atividades enzimáticas FPase máximas obtidas no planejamento experimental para a fermentação em 120 horas de cultivo.	59
Tabela 8 – Tabela dos efeitos dos fatores e das duas interações que foram mantidos no modelo estatístico.	60
Tabela 9 – Tabela Anova ao nível de 5% de significância para atividade de FP no quinto dia.....	61
Tabela 10 – Atividades FPase máximas obtidas nos cultivos com aeração forçada e com aeração natural para <i>T. harzianum</i> IOC-4127 e IOC-3844.....	74
Tabela 11 – Comparação entre a atividade enzimática FPase com aeração forçada e o aumento em relação à fermentação não aerada, obtida por este trabalho e por outros autores	77
Tabela 12 – Teor de umidade e FPase obtidos para os experimentos do planejamento experimental com biomassa de cacau.....	109
Tabela 13 - Teor de umidade e atividade FPase obtidos nos cultivos com aeração forçada para <i>T.harzianum</i> IOC-4127 e IOC-3844.	111
Tabela 14 – Teor de umidade e atividade FPase obtidos nos cultivos com aeração natural para <i>T.harzianum</i> IOC-4127 e IOC-3844.	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	ENZIMAS CELULOLÍTICAS	21
3.1.1	<i>Classificação das celulasas</i>	24
3.2	PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	26
3.2.1	<i>Fungos produtores de celulasas</i>	27
3.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	31
3.3.1	<i>Biorreatores colunas de Rimbault</i>	33
3.4	O CACAU E OS RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA CACAUEIRA	35
3.4.1	<i>Estudos com resíduos de cacau</i>	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	SUBSTRATOS	41
4.2	MICRORGANISMOS E INÓCULO	42
4.2.1	<i>Preparação dos estoques</i>	42
4.2.2	<i>Quantificação de esporos</i>	44
4.3	CULTIVOS EM FRASCOS	45
4.3.1	<i>Estudo do microrganismo</i>	46
4.3.2	<i>Estudo da umidade e da composição do meio sólido</i>	46
4.4	ANÁLISE DE UMIDADE	48
4.5	EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS	49
4.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA FPASE	50
4.6.1	<i>Preparo da solução e curva padrão do DNS</i>	51
4.7	CULTIVOS EM COLUNAS DE RAIMBAULT	52
4.7.1	<i>Aparato experimental</i>	52
4.7.2	<i>Estudo da influência da aeração na produção de celulasas</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	SUBSTRATO E MICRORGANISMOS	55
5.2	CULTIVOS SÓLIDOS EM FRASCOS	56
5.2.1	<i>Estudo do microrganismo</i>	56
5.2.2	<i>Estudo da umidade e da composição do meio sólido</i>	58
5.2.3	<i>Avaliação de teores de umidade inicial mais elevados</i>	66
5.3	CULTIVOS SÓLIDOS EM COLUNAS DE RAIMBAULT	68
5.3.1	<i>Aparato experimental</i>	68
5.3.2	<i>Comparação entre cultivos com aeração forçada e com aeração natural</i>	69
6	CONCLUSÃO	79
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	APÊNDICES	91

APÊNDICE A – Artigo apresentado na modalidade pôster no XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química.	91
APÊNDICE B – Artigo apresentado na modalidade oral no XXI Encontro Nacional de Modelagem Computacional	97
APÊNDICE C – Resultados dos teores de umidade e das atividades enzimáticas dos experimentos realizados.	109

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos estão abundantemente disponíveis no planeta, sendo constituídos por três componentes básicos: a celulose, presente em maior proporção (35 – 50%), a hemicelulose e a lignina, as quais figuram em quantidades variando de 25 a 30% e de 5 a 30%, respectivamente (BEHERA *et al.*, 2017; JUTURU; WU, 2014). A celulose consiste em um polímero linear formado pela repetição de moléculas de glicose, unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (BEHERA *et al.*, 2017; PAYNE *et al.*, 2015).

As celulasas são as únicas enzimas capazes de hidrolisar as ligações existentes na molécula de celulose, desprendendo as unidades de glicose (LYND *et al.*, 2002). Por esse motivo, as enzimas celulolíticas são aplicadas em diversos segmentos industriais, como nas áreas têxtil, de detergentes, de papel e celulose, de alimentos, dentre outras (BEHERA *et al.*, 2017; ZHANG; ZHANG, 2013). Além disso, a aplicação mais visada para essas enzimas atualmente consiste na produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos, conhecido como etanol de segunda geração.

Contudo, o alto custo de produção das enzimas e consequentemente o impacto econômico da aplicação destas na etapa de hidrólise dos materiais lignocelulósicos, corresponde a um dos principais empecilhos do processo de produção do etanol de segunda geração (IDRIS *et al.*, 2017). Dessa forma, é desejável realizar a produção enzimática em um processo de baixo custo, a fim de reduzir o preço final do etanol proveniente de fontes lignocelulósicas, tornando-o, assim, economicamente competitivo (SHARMA *et al.*, 2016).

Nesse contexto, uma alternativa é produzir as celulasas por fermentação em estado sólido (FES), empregando resíduos agroindustriais como suporte e fonte de nutrientes para o crescimento celular. Essa é uma das vantagens consideráveis desse processo, uma vez que o Brasil é um país cuja economia é majoritariamente baseada na agricultura, quantidades expressivas de resíduos são geradas todos os anos. Além disso, os resíduos possuem baixo valor comercial e geralmente são descartados de maneira inadequada, portanto, associando-se com sua composição

lignocelulósica, tem-se um material com potencial para aplicações como substrato na produção de celulasas por FES.

Dentre os resíduos produzidos no Brasil, tem-se àqueles oriundos da agroindústria cacaueira, que em 2018 produziu mais de 255,1 mil toneladas de amêndoas de cacau, parte de fruto que corresponde a apenas 10% da sua massa, gerando, assim, mais de 2,5 milhões de toneladas de resíduos (IBGE, 2019). Comumente, a biomassa de cacau é reaproveitada para ração animal e compostagem, porém alguns componentes da casca do fruto podem ser tóxicos para os animais e ocasionar a disseminação de pragas nas lavouras (SILVA NETO *et al.*, 2001). Dessa forma, ratifica-se a necessidade da busca por alternativas para o reaproveitamento desse resíduo.

A FES consiste em um processo fermentativo, cujo ambiente apresenta pouca ou nenhuma água livre, porém em uma quantidade que seja suficiente para atender as demandas metabólicas do microrganismo (PANDEY, 2003). As condições de fermentação utilizadas influenciam no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na produção das enzimas. Dentre os fatores que influenciam na FES, tem-se a aeração, que está diretamente relacionada à disponibilidade e à transferência de oxigênio no meio de cultivo.

Diante disso, o emprego de aeração forçada em FES é capaz de melhorar a respiração microbiana e promover maior crescimento celular, o que demanda a seleção do biorreator adequado. Em escala laboratorial, podem ser utilizadas as colunas de Raimbault, que correspondem a biorreatores de leito fixo, em que ar úmido é inserido na FES pela base da coluna e ascende ao longo do leito, promovendo a oxigenação do meio e a remoção de produtos oriundos da respiração (calor e gás carbônico) (DURAND, 2003; FARINAS, 2015).

Nesse contexto, este trabalho estudou uma alternativa para reduzir o custo de produção das enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, o seu valor comercial, a partir da utilização de resíduos da agroindústria cacaueira como substrato em um processo de FES. Vale salientar que a publicação de dados relacionados ao uso de resíduos de cacau para produção de celulasas é bastante escasso na literatura científica. Além disso, a diferença na produção enzimática que pode ser causada pelo emprego da aeração forçada em colunas de Raimbault foi investigada, por meio de FES utilizando uma mistura de farelo de trigo e de bagaço de cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a produção de enzimas celulolíticas por meio do processo de fermentação em estado sólido, utilizando biomassa de cacau como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de celulasas pelos microrganismos *Trichoderma harzianum* IOC-4127 e IOC-3844 por FES em frascos erlenmeyers, com meio sólido composto por biomassa de cacau e bagaço de cana-de-açúcar;
- Verificar a influência do teor de umidade e da concentração de casca de cacau na produção das celulasas em cultivos de FES realizados em frascos erlenmeyers, aplicando um planejamento experimental;
- Montagem de aparato experimental para FES utilizando biorreatores colunas de Rimbault;
- Comparar cultivos de *T. harzianum* IOC-4127 e IOC-3844 com aeração forçada e aeração natural, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, e avaliar a influência da aeração na produção das enzimas a partir da medida da atividade enzimática FPase.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

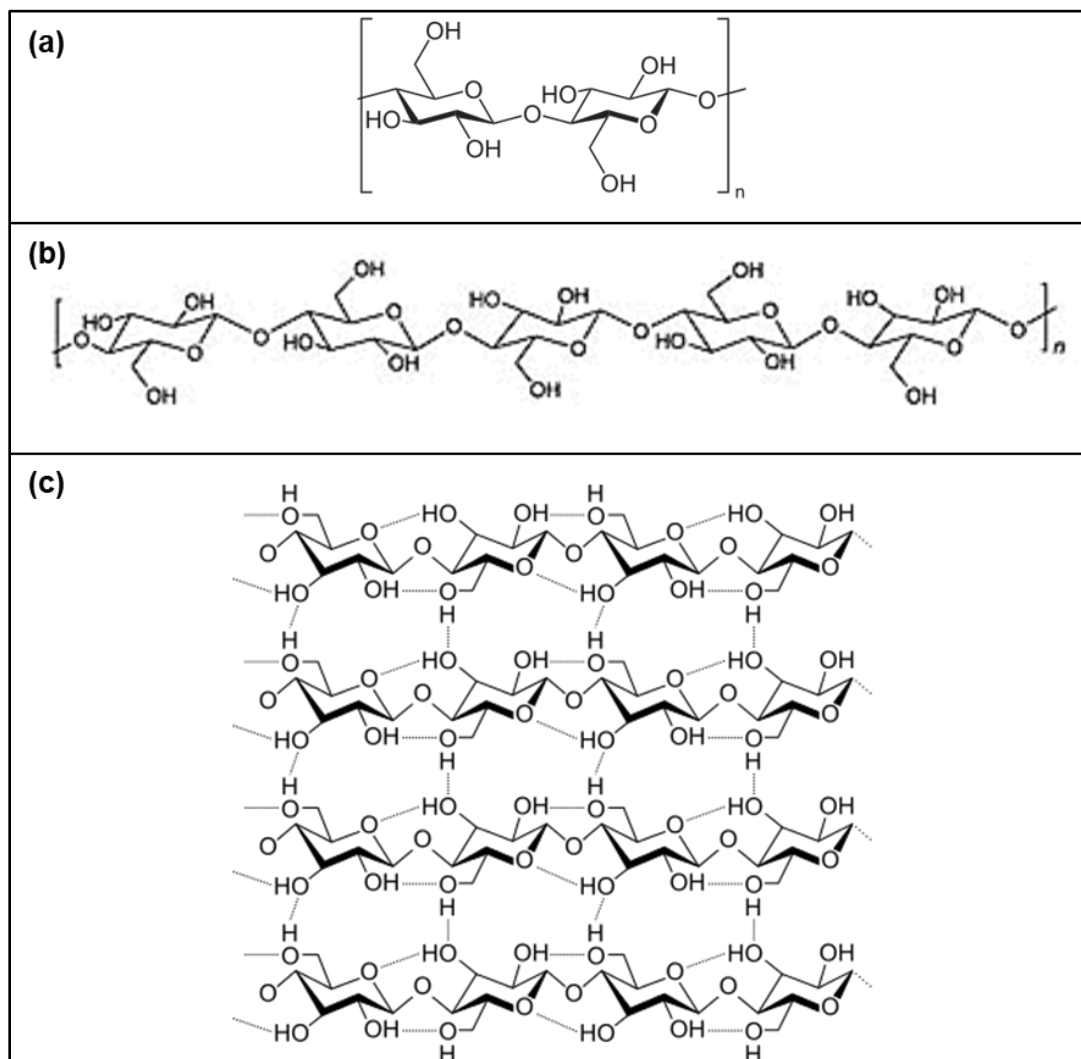
As enzimas são consideradas essenciais para a vida por atuarem como catalisadores das reações bioquímicas, que, embora sejam termodinamicamente favoráveis, ocorrem lentamente. A atuação das enzimas relaciona-se apenas ao aumento da velocidade de reação devido à diminuição da energia de ativação, não alterando, portanto, o equilíbrio químico. O substrato liga-se à enzima no sítio ativo, onde a sua transformação química acontece e os produtos são liberados (CUESTA *et al.*, 2015).

Comumente, as enzimas atuam em reações específicas e são classificadas de acordo com essas reações. Assim, as celulasas estão inseridas na classe das hidrolases, enzimas que clivam ligações covalentes utilizando a água, e na subclasse das glicosilases, ou seja, atuam em compostos formados a partir de subunidades de glicose (NELSON; COX, 2014).

A atuação das enzimas celulolíticas ocorre na molécula de celulose, polímero fibroso, resistente e insolúvel à água e principal constituinte da parede celular dos vegetais, conferindo-lhe força e rigidez. A celulose é constituída por 3.500 a 10.000 moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, em que cada molécula se liga à seguinte com orientação de 180° , formando cadeias não ramificadas. Essas cadeias são alinhadas paralelamente entre si, e ocorrem ligações de hidrogênio inter e intra cadeias, formando regiões cristalinas. Apesar disso, existem também regiões β -1,4-glicosídicas que não apresentam ordenação espacial, configurando regiões amorfas (JUTURU; WU, 2014; KUHAD *et al.*, 2016; NELSON; COX, 2014; STICKLEN, 2008).

Na Figura 1(a) tem-se representação das estruturas químicas da celobiose, formada por duas moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4; (b) do polímero celulósico, formado a partir da repetição da celobiose; e (c) do arranjo dessas cadeias em paralelo, com ligações de hidrogênio intra e inter-cadeias.

Figura 1 – Representação das estruturas químicas da (a) celobiose, da (b) molécula de celulose e das (c) ligações de hidrogênio intra e inter cadeias.



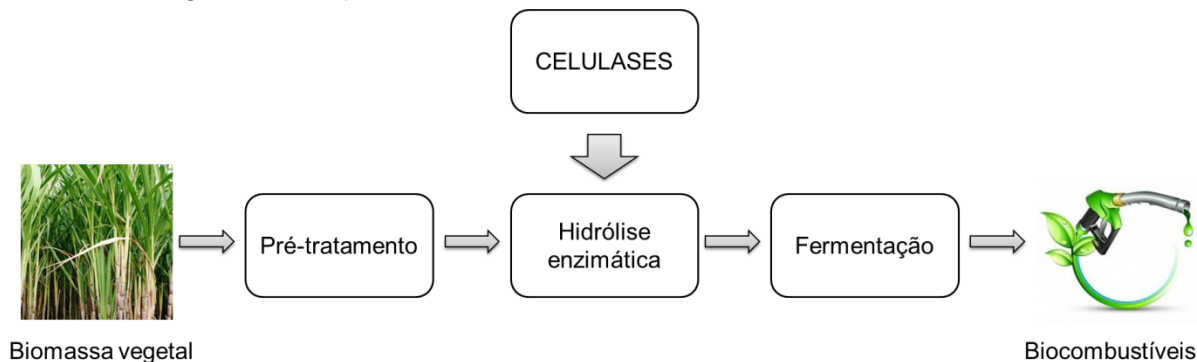
Fonte: Adaptado de Marabezi (2009).

As celulasas distinguem-se de outras enzimas do grupo das glicosil-hidrolases devido a sua capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4-glicosídicas entre os resíduos de glicose existentes na molécula de celulose (LYND *et al.*, 2002). Por esse motivo, diversos segmentos industriais empregam as celulasas em parte do seu processo, como as indústrias de detergentes, de papel e celulose, têxtil, de alimentos e adição à ração animal para favorecer a digestibilidade (BEHERA *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2016; ZHANG; ZHANG, 2013).

Além disso, o uso das celulasas está evidente na produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos, em que as enzimas promovem a digestão da

biomassa, liberando açúcares para a fermentação. A Figura 2 apresenta um esquema desse processo.

Figura 2 – Esquema da conversão de biomassa em biocombustíveis.



Inicialmente, a biomassa vegetal é submetida a um pré-tratamento para remoção da lignina e hemicelulose, já que a combinação desses componentes forma um revestimento em torno das fibras de celulose, dificultando o acesso das enzimas (MCMILLAN, 1994). Após o pré-tratamento, a inserção das celulases ao processo promove a hidrólise enzimática da biomassa, em que a celulose é sacarificada em açúcares fermentescíveis. Na etapa final do processo, os açúcares gerados na hidrólise são utilizados para a fermentação, que tem como produto principal o biocombustível.

A hidrólise enzimática da biomassa consiste em um avanço tecnológico em relação à hidrólise ácida, uma vez que são utilizadas condições operacionais mais brandas (50 °C, pH 4,8 e pressão atmosférica). Além disso, a hidrólise ácida gera um hidrolisado com alto teor de toxicidade, o que prejudica o metabolismo celular (BON, GÍRIO, PEREIRA JUNIOR, 2008).

No entanto, a viabilidade econômica desse processo é o principal fator limitante para o seu emprego em larga escala, visto que as celulases apresentam um elevado valor de mercado. Esse valor é decorrente do custo de produção, que envolve processos de fermentação submersa, os quais originam produtos finais com baixa concentração e que necessitam de etapas adicionais de concentração purificação SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Além disso, normalmente as celulases também precisam ser importadas, o que agrega ainda mais valor ao seu custo de aquisição.

3.1.1 Classificação das celulasas

A conversão efetiva de celulose em açúcares solúveis só é possível quando as enzimas que compõem o complexo celulolítico estiverem disponíveis nas proporções adequadas, atuando sinergicamente. Esse sistema enzimático é composto, basicamente, pelas endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (WANG *et al.*, 2014).

As endoglicanases (EnG) são responsáveis por iniciar o processo de hidrólise, atuando aleatoriamente nas regiões internas da estrutura amorfa da molécula de celulose. Dessa maneira, novas extremidades são formadas na cadeia, sendo um terminal redutor e outro não-redutor. Além disso, são liberados compostos menores, oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010; LYND *et al.*, 2002; SAHA; BOTHAST, 1997; SHARMA *et al.*, 2016; ZHANG; ZHANG, 2013).

As exoglicanases (ExG) atuam nos terminais redutores e não-redutores das cadeias de polissacarídeos da celulose de maneira sucessiva. Neste grupo, encontram-se as glicano-hidrolases (GH), responsáveis por liberar glicose diretamente do polímero, e as celobiohidrolases (CBH), que participam da hidrólise primária da fibra, além de serem capazes de transformar regiões cristalinas da molécula em regiões amorfas. Dessa forma, os produtos principais obtidos pela atuação das ExG são a glicose e a celobiose (LYND *et al.*, 2002; ZHANG; ZHANG, 2013; ZHANG; LYND, 2004).

As β -glicosidases (BG) têm a função de hidrolisar os oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010; LYND *et al.*, 2002). Dentre esses oligossacarídeos encontra-se a celobiose, produto que geralmente inibe a atividade da CBH. Assim, as BG são indispensáveis para o funcionamento eficiente do sistema de enzimas celulolíticas (SAHA; BOTHAST, 1997).

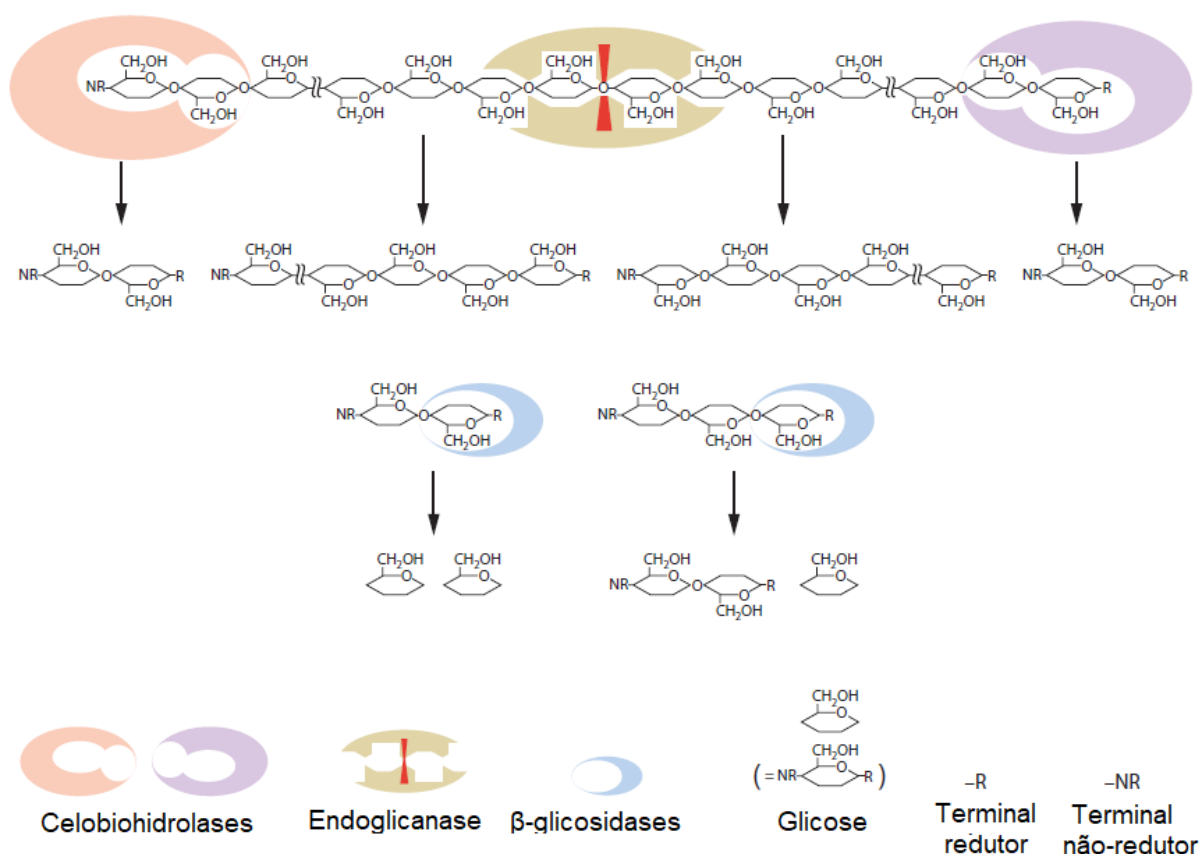
A sinergia consiste no efeito causado pela atuação conjunta das enzimas componentes do complexo celulolítico, o que proporciona um maior rendimento do processo quando comparado com as somas dos rendimentos individuais das enzimas. São reportados, basicamente, os seguintes tipos de sinergia: (i) EnG-ExG, em que ação da EnG libera terminais para que a ExG possa atuar; (ii) ExG-ExG, em que os terminais redutores e não redutores são atacados pelas CBH; (iii) EnG-BG e ExG-BG, em que a BG hidrolisa os produtos liberados pelas EnG e ExG, que podem

atuar como inibidores de determinadas etapas do processo de hidrólise (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010; LYND *et al.*, 2002).

Nesse contexto, os rendimentos de EnG, ExG e BG obtidos durante o processo produtivo de enzimas devem ser suficientes para que ocorra o efeito de sinergia na sacarificação de materiais celulósicos. Isso envolve a seleção adequada de parâmetros de processo que favoreçam a produção dos três tipos de enzimas.

A Figura 3 apresenta um esquema da atuação das enzimas do complexo celulolítico na molécula de celulose.

Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptado de Watanabe e Tokuda (2010).

A quantificação das enzimas que constituem o complexo celulolítico é realizada pela atividade enzimática, que pode ser referente à EnG, ExG e BG de maneira individual ou à celulase total, que envolve a atuação conjunta das enzimas. A determinação da atividade enzimática é realizada a partir da quantidade de açúcares liberados nas

reações de hidrólise, sendo que em cada uma das atividades é utilizado um substrato específico e as atividades são nomeadas de acordo com esse substrato (CMCase, Avicelase, Celobiase e FPase). A unidade internacional (U) para atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcares redutores por minuto na reação de hidrólise.

As EnG têm sua atividade medida a partir da degradação da carboximetilcelulose (CMC), polímero solúvel derivado da celulose, em que as enzimas têm fácil acesso às ligações nas quais atuam. A atividade de ExG é estimada utilizando Avicel, que apresenta alta razão terminal/ acessibilidade. Para determinar a atividade de BG emprega-se a celobiose como substrato da reação enzimática, uma vez que consiste no principal produto que deve ser degradado por essa enzima. A atividade de celulases total representa as atuação das três enzimas que compõem o complexo celulolítico e sua medida é realizada utilizando um substrato insolúvel, tal qual o papel filtro Whatman nº 1.(GHOSE, 1987; ZHANG; HONG; YE, 2009).

3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulases são produzidas por um diversificado conjunto de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesofílicos e termofílicos, utilizando como estratégia de produção tanto a fermentação submersa (FS) quanto a fermentação em estado sólido (FES) (KUHAD *et al.*, 2016; ZHANG; ZHANG, 2013). No entanto, apenas um pequeno número desses microrganismos produz níveis elevados de celulase extracelular capazes de solubilizar a celulose cristalina. Outrossim, poucos deles têm habilidade de excretar as três enzimas integrantes do complexo celulolítico, dificultando a conversão completa da celulose em açúcares fermentescíveis (KUHAD *et al.*, 2016).

Embora fungos e bactérias sejam eficientes produtores de celulases, a utilização dos fungos para esse processo é mais aplicada, uma vez que esses microrganismos secretam quantidades elevadas de celulases para o meio, o que facilita a extração e a purificação das enzimas (KUHAD *et al.*, 2016). No âmbito industrial, as celulases comerciais são produzidas com base na utilização de espécies dos gêneros

Trichoderma e *Aspergillus* (BRETHAUER; STUDER, 2015; ZHANG; ZHANG, 2013) em processos de FS.

A FS caracteriza-se por possuir elevada quantidade de água livre no meio de cultivo, onde os substratos estão solubilizados. Comumente, esse tipo de estratégia de fermentação é aplicado na produção industrial de celulasas, visto que o meio homogêneo facilita a reprodutibilidade, o monitoramento e o controle do processo, em detrimento da FES. Além disso, em meio líquido há maior facilidade na transferência de massa, calor e oxigênio (CASCIATORI, 2015).

Os fungos filamentosos também são os microrganismos mais empregados nos processos de FES, devido à semelhança existente entre o ambiente fermentativo e o seu habitat natural. Os fungos crescem nas superfícies das partículas do material e os filamentos penetram os espaços vazios ao longo da matriz sólida, em direção ao interior do leito, aumentando assim a acessibilidade aos nutrientes presentes no substrato. (PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998). Outro fator que favorece o emprego de fungos para FES é a boa tolerância que esses microrganismos apresentam em relação a ambientes com baixa atividade de água e alta pressão osmótica (RAIMBAULT, 1998; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

3.2.1 *Fungos produtores de celulasas*

Inúmeras espécies de fungos são capazes de produzir as enzimas do complexo celulolítico. Observa-se que na literatura científica existe um extenso número de estudos que abordam a produção de celulasas utilizando fungos, a partir de variadas fontes de energia e nutrientes, tanto em FES quanto em FS. A Tabela 1 apresenta alguns fungos capazes de excretar celulasas, utilizando diferentes substratos e condições de fermentação.

A grande dificuldade da produção de celulasas está na excreção dos teores adequados de cada enzima componente do complexo enzimático. Assim, verifica-se a necessidade de aumento da produtividade a partir de diferentes métodos (KUHAD *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2014).

A seleção das condições de fermentação ideais para a produção de celulasas é essencial, contudo existem outros métodos capazes de aprimorar a produção dessas enzimas. Pode-se realizar a modificação genética de cepas, aumentando o rendimento das celulasas e a qualidade dessas enzimas; a realização de co-culturas de diferentes cepas produz sistemas enzimáticos mais completos, o que é favorável para a hidrólise; e a aplicação do biorreator mais adequado, o que pode reduzir problemas de transferência de calor e massa (YOON *et al.*, 2014).

Nesse contexto, Chandra *et al.* (2009) desenvolveram uma cepa mutante de *Trichoderma citrinoviride* e obtiveram aumento no nível de todas as enzimas excretadas. Fang e Xia (2013) verificaram aumento de 5,4 vezes nas atividades enzimáticas de CBH e 4,3 vezes na atividade de FPase, ao realizar a modificação genética de uma cepa de *Trichoderma reesei*. Além disso, a hidrólise enzimática a partir dessas enzimas foi mais eficiente do que a partir da cepa original.

Tabela 1 – Fungos produtores de celulases empregando diferentes substratos e condições de cultivo e seus respectivos resultados.

Fungo	Substrato	Condições de fermentação	Atividades enzimáticas	Referência
<i>Acremonium celullolyticus</i> CF-2612	Palha de arroz	FS, frasco, 220 rpm, 30 °C, 7 dias.	CMCase: 353 U/mL FPase: 10,8 FPU/mL	(HIDENO <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	Palha de milho	FES, frasco, umidade: 80%, pH 4,0, 50 °C, 4 dias	CMCase: 526,3 U/gms FPase: 144,6 U/gms	(LIU, D. <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus niger</i> NS-2	Farelo de trigo	FES, frasco, umidade: 60%, 30 °C, 10 dias	CMCase: 310,6 U/gms FPase: 16,8 U/gms BGL: 33 U/gms	(BANSAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus niger</i> CKB	Resíduo têxtil	FES, placas de Petri, pH 7,29, umidade: 78%, 28 °C, 6 dias	FPase: 1,56 U/g	(HU <i>et al.</i> , 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de cacau	FES, frasco, atividade de água 0,976, 30°C, 72 h	CMCase: 14,38 U/mL FPase: 7,83 U/mL	(SANTOS <i>et al.</i> , 2013a)
<i>Penicillium decumbens</i> ML-017	Farelo de arroz	FES, pH 5,7, umidade: 72%, 30 °C, 72 h	FPase: 5,76 UI/g	(LIU, Y-T. <i>et al.</i> , 2011)
<i>Penicillium echnulatum</i> S1M29	Capim elefante	FS, frasco, 180 rpm, 28 °C	CMCase: 3,3 UI/ mL FPase: 0,37 UI/ mL	(SCHOLL <i>et al.</i> , 2015)

(continuação)

<i>Penicillium oxalicum</i> IODBF-5	Avicel e Farelo de trigo	FS, reator agitado, 7 L, 1 vvm até 72 h, 1,5 vvm após 72h, pH 5,0, 28 °C, 96 h	FPase: 1,29 FPU/ mL	(SAINI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trichoderma harzianum</i> HBA03	Esgoto doméstico	FS, coluna de bolhas 5 L, 30°C, 1vvm, 144 h	CMCase: 8,3 U/mL FPase: 1,46 U/mL	(LIBARDI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC- 3844	Bagaço de cana-de- açúcar	FS, frasco, 200 rpm, 30 °C, 72 h	CMCase: 6,358 U/L FPase: 445 U/L BGL: 742 U/L	(CASTRO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Trichoderma harzianum</i> KUC1716	Palha de cevada	FS, frasco, 27 °C, 150 rpm, 7 dias	FPase: 0,60 U/ mL	(LEE <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trichoderma koningii</i> AS3.4262	Resíduos da indústria de vinagre	FES, frasco, pH 5,0 umidade: 50%, 30 °C, 84 h	CMCase: 23,76 UI/gms FPase: 6,90 UI/gms	(LIU; YANG, 2007)
<i>Trichoderma koningii</i> INCQS 40331 (CFAM 422)	Bagaço de cana-de- açúcar	FES, frasco, umidade: 50%, 28 °C, 3 dias.	CMCase: 8,199 UI/gs	(SALOMÃO, 2017)
<i>Trichoderma reesei</i> LCB 48	Resíduo de acerola	FES, frasco, 30 °C, umidade: 45%, 216 h	CMCase: 1,25 U/gs	(MÉLO, 2016)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Farelo de trigo	FES, bandejas, umidade: 57%, 30 °C, 14 dias	CMCase: 457 UI/gms	(IDRIS <i>et al.</i> , 2017)

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

O processo fermentativo no qual os microrganismos são cultivados em um ambiente com ausência, ou próximo da ausência, de água livre é definido como fermentação em estado sólido (FES). Vale ressaltar que o substrato deve apresentar umidade suficiente para garantir o crescimento celular e as atividades metabólicas do microrganismo (FARINAS, 2015; PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998; SOCCOL *et al.*, 2017).

Existem dois tipos de sistemas de FES, de acordo com a natureza e função do meio sólido no processo: (i) o material sólido é de origem natural e tem as funções de suporte e de fonte de energia e nutrientes; e (ii) o material sólido funciona apenas como um suporte físico inerte, impregnado com um meio líquido (OOIJKAAS *et al.*, 2000; PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998; SOCCOL *et al.*, 2017). A matriz sólida deve apresentar grande área por unidade de volume, para que ocorra o crescimento microbiano na interface sólido-gás (RAIMBAULT, 1998).

De uma maneira geral, quando comparada com a FS, a FES apresenta inúmeras vantagens, tanto do ponto de vista ambiental quanto do econômico. Por se tratar de um processo conduzido na ausência de água livre, há um consumo mínimo de água e, conseqüentemente, uma baixa produção de efluente aquoso (FARINAS *et al.*, 2011; HÖLKER; LENZ, 2005). Além disso, não é necessário utilizar agentes antiespumantes e, em determinadas situações, é possível realizar o processo de FES em condições semi-estéreis, reduzindo a demanda por energia e equipamentos para esterilização (HÖLKER; LENZ, 2005). Pode-se citar, ainda, que a FES demanda baixo investimento e consiste em um processo de fácil operação, dispensando mão-de-obra qualificada (IDRIS *et al.*, 2017).

No caso da produção de enzimas, a FES fornece maiores produtividades volumétricas, uma vez que dispõe de um meio de cultivo mais concentrado, é um processo menos suscetível a problemas de inibição pelo substrato e as enzimas produzidas apresentam maior estabilidade em relação à temperatura e ao pH (HÖLKER; LENZ, 2005).

Uma vantagem considerável da FES é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato e suporte para o crescimento microbiano. Esses resíduos são subprodutos oriundos da atividade agrícola, gerados em grandes quantidades e apresentam

baixo valor comercial. A disposição desse resíduo sem o tratamento adequado pode ocasionar problemas ambientais e proliferação de doenças.

Na literatura científica, inúmeros estudos a cerca da produção de celulasas por FES podem ser encontrados. Nesses estudos, são empregados os mais variados tipos de resíduos e diferentes tipos de microrganismos capazes de produzir essas enzimas. Dentre os resíduos utilizados, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) está disponível em maior quantidade, podendo ser empregado em FES como fonte de energia ou como suporte inerte natural. A aplicação do BC como suporte inerte fornece condições aeróbicas homogêneas ao longo do reator, impedindo o empacotamento do substrato, além de facilitar a extração dos produtos (OOIJKAAS *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000).

Farinas *et al.* (2008) avaliaram a produção de celulasas com *Aspergillus niger* utilizando quatro diferentes resíduos agroindustriais como substratos: bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja. Os melhores resultados foram de 6,65 FPU/g e 5,25 UI/g para β -glicosidase, ambos em farelo de soja. Já a melhor atividade CMCase (12,76 UI/g) foi alcançada com o bagaço de laranja.

Oliveira Júnior (2014) utilizou uma mistura de 50% de bagaço de coco e 50% de pedúnculo de caju como substratos para a produção de celulasas por fermentação semissólida, com *Penicillium chrysogenum*. Os melhores resultados encontrados foram 0,294 UI/mL para a CMCase e 0,058 UI/mL para a FPase.

Kilikian *et al.* (2014) estudaram a produção de celulasas por diferentes fungos filamentosos, sendo os cultivos sólidos desenvolvidos utilizando bagaço de cana, farelo de trigo e farelo de soja. A maior atividade FPase encontrada foi 10,6 U/gms, em meio sólido coonstituído por uma mistura de 10% de farelo de soja e 90% de bagaço de cana, com o fungo *Myceliophthora thermophila*.

Brito (2015) avaliou a capacidade da produção das enzimas celulolíticas pelo microrganismo *Aspergillus oryzae*, a partir da fermentação em estado sólido da casca de arroz e casca de amendoim. As maiores atividades enzimáticas obtidas foram para a casca de amendoim, sendo 4,29 U/mL de atividade CMCase e 0,400 U/mL de atividade FPase.

Ortiz *et al.* (2015) estudaram a possibilidade de utilizar os resíduos agroindustriais farelo de trigo, casca de algodão, feno de alfafa, dente de leão, palha de aveia e chá

verde, para produção de celulases com *Trichoderma reesei* em biorreator tambor rotativo. A maior atividade FPase foi obtida com farelo de trigo e, após a otimização da umidade, foram alcançados 3,8 U/gms de atividade FPase.

Bagewadi, Mulla e Ninnekar (2017) estudaram a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* utilizando diferentes resíduos agroindustriais, tanto em FES quanto em FS. As maiores atividades enzimáticas para todos os resíduos ocorreram empregando a FES, sendo 5,56 U/gms para FPase e 30,32 U/gms para CMCase, utilizando o sorgo sacarino como substrato.

Carvalho *et al.* (2018) utilizaram casca de café como substrato para produção de celulases por *Trichoderma reesei* BTF 0948 e *Trichoderma koningii*. Os melhores resultados obtidos foram 12,92 U/gms e 4,05 U/gms de atividade CMCase e FPase, respectivamente, para *T. reesei* BTF 0948; e 28,7 U/gms e 4,49 U/gms de atividade CMCase e FPase, respectivamente, para *T. koningii*.

Assim, verifica-se que a aplicação de resíduos agroindustriais na produção de celulases é bastante promissora, uma vez que as atividades enzimáticas obtidas nos estudos citados apresentaram valores consideráveis. Como esses resíduos possuem baixo valor comercial, isso poderia acarretar na redução do custo das enzimas, tornando-as mais acessíveis e reduzindo o problema do descarte de resíduos.

3.3.1 Biorreatores colunas de Raimbault

Diversos tipos de biorreatores são descritos na literatura para realização de processos fermentativos em estado sólido (DURAND, 2003). Dentre aqueles aplicados para ensaios laboratoriais, pode-se citar as colunas de Raimbault, reatores de fácil operação e com baixo custo, sendo amplamente empregados em estudos de FES.

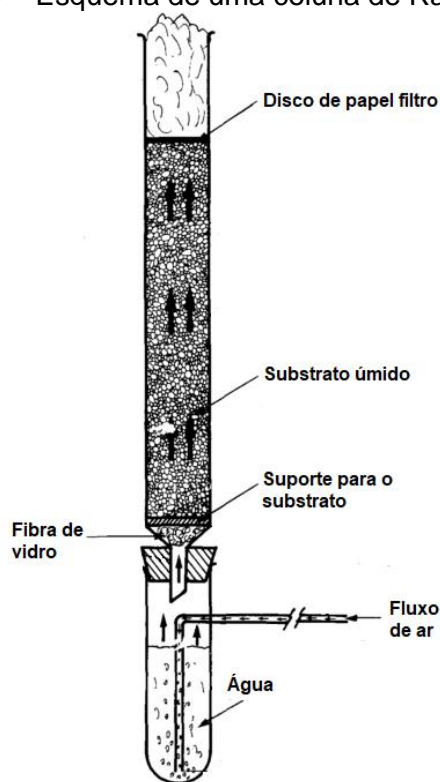
Os biorreatores tipo colunas de Raimbault foram desenvolvidos e patenteados por Raimbault e Germen (1976) e consistem em reatores de leito empacotado, que são preenchidos com material sólido e o inóculo para a fermentação. O substrato é

suportado por uma base perfurada por onde ar saturado é forçado e passa através do leito, em direção ao topo da coluna (DURAND, 2003; FARINAS, 2015).

É possível analisar a respiração microbiana, por meio do ar de saída das colunas e, conseqüentemente, verificar o crescimento celular por relação com o gás carbônico liberado (DURAND, 2003; RAIMBAULT, 1998). A manutenção da temperatura de cultivo é realizada pela utilização de banho termostático a temperatura constante.

A Figura 4 mostra um esquema do reator, que foi utilizado por Raimbault e Alazard (1980) para o cultivo de *Aspergillus niger* em resíduo de mandioca. Nesse sistema, a aeração é forçada pela parte inferior da coluna, passa por um recipiente com água, a fim de umidificar a corrente de ar. O ar saturado percorre o meio sólido contendo o microrganismo e o substrato e sai pelo topo da coluna, carregando o gás carbônico e o calor produzidos pelo metabolismo celular.

Figura 4 – Esquema de uma coluna de Raimbault.



Fonte: Adaptado de Raimbault e Alazard (1980).

Como exemplos da produção de enzimas utilizando esse tipo de biorreator, Cavalvanti *et al.* (2005) produziram lipases com *Penicillium simplicissimum* e torta de babaçu como substrato, estudando diferentes condições de aeração, sendo a vazão 0,8 L/min a que proporcionou a maior atividade enzimática. Rodríguez-Duran *et al.*

(2011) estudaram a produção de tanases com *Aspergillus niger*, e espuma de poliuretano de alta densidade como suporte inerte e ácido tânico como fonte de carbono e indutor, utilizando fluxos de ar de 20 e 60 mL/min. Rocky-Salimi e Hamidi-Estefahani (2010) estudaram a produção de celulasas em colunas de Raimbault, variando a aeração de 263 a 790 mL/ min, cultivando *Trichoderma reesei* em farelo de arroz.

Outros produtos também podem ser obtidos por FES em colunas de Raimbault, como realizado por Silvinski (2012), que estudou a produção de biosurfactante utilizando *Bacillus pumilus* em uma mistura de okara (resíduo sólido da extração do leite de soja) e bagaço de cana-de-açúcar, em colunas de Raimbault com aeração forçada de 200 mL/ min. França (2016) avaliou a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em FES com bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça, aplicando uma aeração de 0,2 L/min.

Oliveira *et al.* (2017) cultivaram *Fusarium moniliforme* em polpa cítrica para produção de ácido giberélico, um produto que auxilia no desenvolvimento de plantas lenhosas, ajustando a vazão de ar em 30 mL/min. A produção em FES com aeração forçada proporcionou aumento de 13,72% em relação a frascos erlenmeyers sob as mesmas condições. Além disso, de todos os experimentos realizados, nesses biorreatores foram obtidas as maiores produção e produtividade.

3.4 O CACAU E OS RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA CACAUEIRA

A semente do cacau (*Theobroma cacao* L.) consiste no seu principal produto comercial, que é a matéria-prima básica para a produção de chocolates e de produtos das indústrias farmacêutica e de cosméticos. Porém, outros produtos podem ser comercializados a partir do cacau, como o suco, geleias, destilados, dentre outros produtos oriundos da polpa. (CEPLAC, 2018).

Com relação ao chocolate, atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabelece que o chocolate fabricado e comercializado no Brasil deve ter, no mínimo, 25% de cacau. Contudo, a fim de promover maior utilização do cacau

brasileiro, o projeto de Lei 93/2015 em tramitação no Senado pretende aumentar esse percentual para 35%, como ocorre em outros países, e tornar obrigatória a apresentação dessa informação no rótulo dos produtos (SENADO, 2018).

No cenário mundial, o Brasil figura na 7ª posição na produção de cacau, o que representa cerca de 4% do total (LEITE, 2018). Em 2018, foram produzidas mais de 255,1 mil toneladas de amêndoas no Brasil, sendo o Espírito Santo o 3º maior produtor nacional contribuindo com 10,2 mil toneladas, que correspondem a 4,0% da produção brasileira (IBGE, 2019). Grande parte dessa produção é exportada, enquanto outra parte é insuficiente para atender a demanda nacional, o que torna necessário a importação do cacau de outros países.

Para que as sementes obtenham qualidade para a atividade comercial, o cacau é submetido a um processo de beneficiamento, o qual envolve a colheita e a quebra do fruto, seguido da fermentação e secagem das sementes. Durante esse processo, quantidades expressivas de resíduos e subprodutos são geradas, uma vez que a amêndoa corresponde a apenas 10% do peso total do cacau (SILVA NETO *et al.*, 2001). A Tabela 2 mostra os valores aproximados para os componentes físicos de um cacau maduro.

Tabela 2 – Valores aproximados de alguns componentes físicos do cacau maduro.

Componente	Peso (g)	% em relação à massa total
Fruto	500	100
Casca do fruto	400	80
Sementes frescas	100	20
Semente seca (amêndoa)	50	10
Nibs (cotilédones limpos)	40	8

Fonte: FREIRE *et al.* (1990).

Dessa forma, verifica-se que o resíduo lignocelulósico do cacau é composto basicamente pela casca, que representa cerca de 80% da sua massa total. Esse resíduo pode ser utilizado para várias finalidades, como a alimentação de bovinos, suínos, aves e peixes, tanto *in natura* como na forma de farinha. No entanto, a baixa digestibilidade de alguns nutrientes e o alto teor de fibras presentes na casca de cacau tornam essa aplicação limitada (FREIRE *et al.*, 1990; SILVA NETO *et al.*, 2001).

Freire *et al.* (1990) e Silva Neto *et al.* (2001) ressaltam ainda que outras finalidades podem ser dadas à casca do cacau. Dentre essas práticas pode-se citar o empilhamento dos resíduos em montes, para sofrerem decomposição e, posteriormente, serem utilizados como fertilizante nos cacaueiros. Porém essa atividade pode acarretar na disseminação de doenças através das lavouras.

Além disso, a casca de cacau pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biogás e biofertilizantes. Contudo, é necessário que se faça uma moagem fina do material, o que requer alto custo energético, podendo ainda haver obstrução da saída de efluente e deposição no fundo do digestor (FREIRE *et al.*, 1990).

Com isso, constata-se a necessidade do estudo de alternativas para o reaproveitamento dos resíduos do cacau, que beneficiem esse produto, tornando-o um material economicamente atrativo, e a sociedade como um todo. Por se tratar de um resíduo agroindustrial, sua estrutura possui, em maior proporção, moléculas de celulose que podem assumir o papel importante em processos biotecnológicos, tanto como substrato para o crescimento de microrganismos na produção de enzimas celulolíticas, quanto como fonte de glicose para produção do etanol de segunda geração.

Silva (2018) caracterizou a biomassa de cacau e encontrou elevado teor de celulose, o que evidencia seu potencial como fonte de carbono para processos fermentativos. Além disso, uma quantidade significativa de cinzas também foi encontrada, o que contribui para a nutrição microbiana, por representar a fração mineral presente no material. A Tabela 3 indica a composição do resíduo lignocelulósico do cacau encontrado por Silva (2018).

Tabela 3 – Composição química da casca do cacau.

Componente	% (casca <i>in natura</i>)
Umidade	7,30
Celulose	32,46
Hemicelulose	20,05
Lignina	18,24
Extrativos	30,56
Cinzas	7,10

Fonte: Silva (2018).

3.4.1 Estudos com resíduos de cacau

A literatura científica é bastante limitada no que concerne à utilização de casca de cacau para processos biotecnológicos, principalmente no que diz respeito à produção de enzimas. Portanto a seguir são abordados alguns estudos utilizando a biomassa de cacau para diversas finalidades.

Alemawor *et al.* (2009) investigaram a viabilidade de utilizar a fermentação da casca de cacau com *Pleurotus ostreatus*, a fim de melhorar as condições nutricionais desse resíduo, variando o tempo de fermentação e o teor de manganês suplementado ao meio. Os resultados encontrados foram considerados satisfatórios, pois demonstraram uma redução significativa nos teores de fibra e lignina associada a um aumento nos teores de proteína e carboidratos solúveis na casca de cacau.

Santos *et al.* (2011) utilizaram casca de cacau para produzir lacase, lignina peroxidase e Mn peroxidase por FES, com *Aspergillus niger* variando o tempo de fermentação e o teor de umidade do meio sólido. Para todas as enzimas estudadas, as atividades foram máximas após 72 horas de fermentação e com 50% de umidade.

Santos *et al.* (2013a) avaliaram o efeito da atividade de água e do tempo de fermentação sobre a produção das enzimas celulase e xilanase, utilizando farelo de cacau e o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Os resultados atingiram 14,4 U/mL para a CMCase, 7,8 U/mL para a FPase e 11,8 U/mL para a xilanase, constatando que o farelo de cacau é um resíduo promissor para a produção enzimática por FES.

Santos *et al.* (2013b) estudaram a produção de celulases por FES em diversos resíduos da fruticultura, dentre eles o resíduo de cacau, com *Aspergillus niger*. Os resultados para as atividades enzimáticas CMCase e FPase para esse resíduo foram 4,56 U/mL e 7,08 U/mL, respectivamente.

Amorim *et al.* (2017) utilizaram resíduos do processamento do cacau para o cultivo de *Aspergillus awamori* IOC-3914, a fim de reduzir as metilxantinas presentes no resíduo (teobromina e cafeína) e produzir xilanases. A atividade enzimática de xilanase atingiu 72 U/g, e os teores de teobromina e cafeína sofreram redução de 69% e 63%, respectivamente.

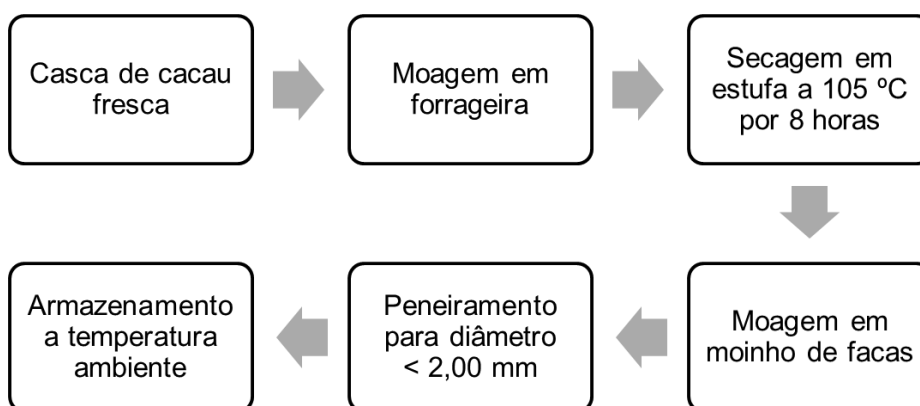
Silva (2018) estudou a viabilidade do uso da casca do cacau como matéria-prima para a produção do bioetanol, a partir da hidrólise ácida do resíduo pré-tratado quimicamente. O teor de açúcares redutores totais no hidrolisado atingiu 13 g/L e o teor alcoólico obtido na fermentação permaneceu em torno de 19%, resultados que demonstram que os resíduos de cacau consistem uma fonte promissora para produção de bioetanol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUBSTRATOS

A casca de cacau (CC) foi gentilmente cedida pela Agroindústria Chocolates Espírito Santo, situada em Rio Novo do Sul-ES. O material foi triturado ainda fresco em uma forrageira (Trapp, TRF 80 junior) e armazenado em congelador a -4°C . Para a realização dos experimentos, a casca foi submetida à secagem em estufa (Quimis, Q314M-32) a 105°C por aproximadamente 8 horas e posteriormente foi triturada em moinho de facas (Marconi) e peneirada para obtenção de partículas com diâmetro inferior a 10 mesh (2,00 mm). Após essas etapas, armazenou-se a CC em sacos plásticos a temperatura ambiente. A Figura 5 apresenta um esquema das etapas envolvidas na preparação da CC.

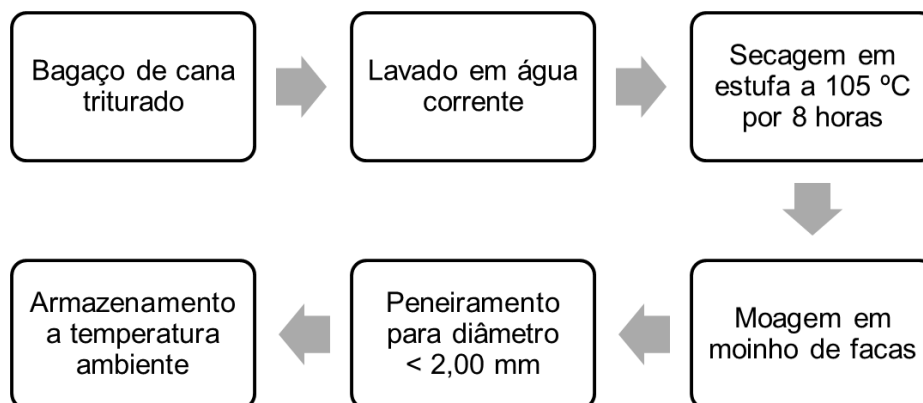
Figura 5 – Etapas da preparação da casca de cacau.



O bagaço de cana-de-açúcar (BC) foi obtido na Usina Paineiras, localizada em Itapemirim-ES, já triturado. Esse material foi armazenado em congelador a -4°C até o uso, sendo lavado em água corrente e seco em estufa (Quimis, Q314M-32) a 105°C por aproximadamente 8 horas. O BC foi triturado em partículas menores em um moinho de facas (Marconi) e peneirado para obtenção da granulometria inferior a 10 mesh (2,00 mm). Após essas etapas, armazenou-se o BC em sacos plásticos a

temperatura ambiente. Um esquema das etapas de preparação da casca de cacau está indicado na Figura 6.

Figura 6 – Etapas da preparação da casca de cacau.



O farelo de trigo (FT) era da marca Nayná e foi utilizado na preparação dos estoques e nos ensaios de colunas. Esse substrato foi adquirido em supermercado e armazenado em geladeira a 6 °C.

4.2 MICRORGANISMOS E INÓCULO

4.2.1 Preparação dos estoques

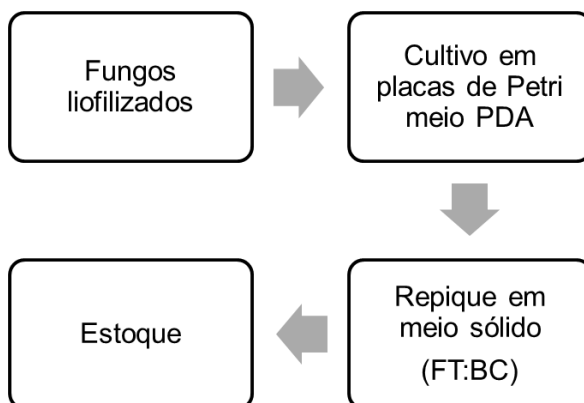
Este trabalho estudou o potencial celulolítico dos fungos filamentosos *Trichoderma harzianum* IOC-4127 e *Trichoderma harzianum* IOC-3844, que foram obtidos liofilizados da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/ CCFF), localizada no Rio de Janeiro-RJ.

Os liófilos foram reidratados conforme orientação da Fiocruz e a suspensão formada foi transferida para seis placas de Petri (três para cada linhagem), contendo cerca de 15 mL o meio PDA (Potato-dextrose-ágar) em concentração de 39 g/L. As placas

foram conservadas em estufa bacteriológica (Nova Instruments NI 1522) a 30 °C durante 7 dias.

Dispondo dos fungos em placas de Petri, realizou-se o seu repique no meio sólido por meio de um processo de raspagem. Foram preparados seis frascos erlenmeyers de 500 mL (um para cada placa de Petri), contendo 10 g de meio sólido em proporção 20:80 (FT:BC) e 60% de umidade inicial (KILIKIAN *et al.*, 2014). Os frascos foram inoculados com o conteúdo total da placa de Petri e incubados a 30 °C em estufa bacteriológica (Nova Instruments NI 1522) por 7 dias.

Figura 7 – Etapas da preparação dos estoques de esporos.



O teor de umidade inicial no meio sólido foi atingido pelo uso da solução salina descrita por Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, (2000), conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Composição da solução salina utilizada para umidificação do meio sólido.

Composto	Concentração
KH_2PO_4	5,0 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
NaCl	1,0 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/L
MnSO_4	1,6 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,45 mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg/L

Fonte: Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, (2000).

O volume total de solução salina a ser acrescentado ao meio para atingir o teor de umidade desejado foi calculado conforme Equação 1, considerando-se base úmida. Uma parte do volume foi adicionada ao meio sólido antes da esterilização e outra parte utilizada para solubilizar o inóculo.

$$V_{ss} = m_{ss} = \frac{U \cdot M}{100 - U} \quad (1)$$

Onde V_{ss} (mL) é o volume de solução salina, considerado equivalente a sua massa m_{ss} (g), necessário para atingir o teor de umidade U (%), utilizando uma massa M (g) de material sólido.

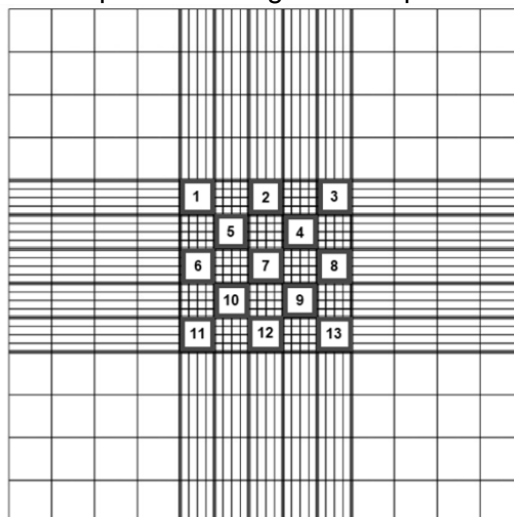
4.2.2 Quantificação de esporos

A concentração de inóculo utilizada nas fermentações foi calculada a partir da quantidade de esporos presentes nos estoques, a qual foi determinada utilizando a câmara de Neubauer.

Cerca de 1,0 g do sólido fermentado foi diluído em água destilada, até observância de coloração de menor intensidade, e 2 gotas do surfactante Tween 80. Uma alíquota de 100 μ L da amostra diluída foi adicionada à câmara de Neubauer (Qualividros; profundidade: 0,100 mm; área: 0,0025 mm²) e realizou-se a contagem de esporos nos dois reticulados em microscópio ótico Bioval com aumento de 1000 vezes na objetiva.

A câmara é constituída por dois reticulados, onde a contagem deve ser realizada de maneira uniforme. A contagem dos esporos foi realizada em 13 campos em cada reticulado, conforme ilustrado na Figura 8, totalizando 26 campos de contagem.

Figura 8 – Esquema dos campos de contagem de esporos na câmara de Neubauer.



A concentração de esporos na suspensão foi determinada segundo Pinheiro (2003):

$$C_{susp} = \frac{D_a \cdot N}{V_{campo}} \quad (2)$$

Onde C_{susp} é a concentração de esporos da suspensão (esporos/mL); D_a é o fator de diluição; N é o número médio de esporos nos campos medidos; V_{campo} é o volume de cada campo (área do campo 0,0025 mm² multiplicada pela espessura de filme líquido - 0,1 mm).

4.3 CULTIVOS EM FRASCOS

Inicialmente, vale salientar que todos os materiais e reagentes utilizados nas fermentações foram previamente esterilizados em autoclave vertical Phoenix Luferco AV-100 a 121 °C por 20 minutos. As inoculações do meio de cultivo foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical (Jdeoximar, FLV 1040) após a sua limpeza com álcool etílico 70% e manutenção de iluminação ultravioleta por 30 minutos.

4.3.1 *Estudo do microrganismo*

Em primeiro lugar foi necessário determinar o comportamento da atividade enzimática de FPase em relação ao tempo de fermentação e traçar a cinética de produção de celulasas. Para tanto, foram realizados cultivos em frascos de 500 mL contendo 10 g de material sólido na proporção 40:60 (CC:BC) e 60% de umidade inicial, com 0,1 g de inóculo das duas linhagens de *T. harzianum*. Os frascos foram incubados a 30 °C e a cada 24 horas um frasco era retirado da estufa para realização da extração de celulasas e análise do teor de umidade (KILIKIAN *et al.*, 2014).

4.3.2 *Estudo da umidade e da composição do meio sólido*

O teor de umidade inicial e a proporção de casca de cacau presente no meio sólido foram variados a fim de identificar as melhores condições de cultivo para a produção de celulasas, empregando o microrganismo que apresentou maiores valores de atividade enzimática no item 4.3.1.

Utilizando a atividade enzimática FPase como variável de resposta, realizou-se um delineamento fatorial completo com duas variáveis independentes, cada qual com três níveis, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento experimental para a fermentação.

Variável	(-1)	(0)	(+1)
Umidade (%)	50	60	70
Casca de Cacau (%)	40	50	60

Além dos experimentos do planejamento 3^2 , foram realizados três experimentos no ponto central, para calcular o erro padrão e os resíduos (RODRIGUES; IEMMA, 2005), totalizando 11 experimentos. A matriz completa desse planejamento está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Planejamento experimental para a fermentação.

Experimento	CC (%)	Umidade (%)
1	-1 (40)	-1 (50)
2	+1 (60)	-1 (50)
3	0 (50)	-1 (50)
4	-1 (40)	+1 (70)
5	+1 (60)	+1 (70)
6	0 (50)	+1 (70)
7	-1 (40)	0 (60)
8	+1 (60)	0 (60)
9	0 (50)	0 (60)
10	0 (50)	0 (60)
11	.0 (50)	0 (60)

4.3.2.1 Análises estatísticas

A partir dos resultados, foram realizadas análises estatísticas e as significâncias dos fatores e das interações foram identificadas com base no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo estatístico que descreve as atividades enzimáticas FPase em função das variáveis independentes do planejamento fatorial é dado pela regressão (HU *et al.*, 2018; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{1122} x_1^2 x_2^2 + \beta_{122} x_1 x_2^2 + \beta_{112} x_1^2 x_2 \quad (3)$$

Onde β_0 é o valor da média de todas as respostas do planejamento e β_1 , β_2 , β_{12} são os coeficientes dos efeitos individuais e do efeito de interação lineares, respectivamente; β_{11} , β_{22} , β_{1122} são os coeficientes dos efeitos individuais e do efeito de interação quadráticos; β_{122} , β_{112} são os coeficientes dos efeitos de interação quadráticos e lineares; x_1 e x_2 são as variáveis codificadas (-1, 0, +1) para umidade e casca de cacau, respectivamente; e Y é a variável dependente, que corresponde à atividade FPase.

A significância dos efeitos da Equação 3 foi avaliada pela tabela de análise de variância (ANOVA), baseadas no teste F. A significância estatística do modelo foi determinada pela significância da regressão e a não-significância da falta de ajuste, também de acordo com o teste F. Para verificar o ajuste do modelo, utilizaram-se os valores do coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado) (HU *et al.*, 2018).

Ainda, traçou-se a superfície de resposta e a curva de nível da atividade enzimática FPase em função da umidade inicial e da concentração de casca de cacau no meio. Assim, observou-se em quais condições era observada a maior atividade enzimática FPase para o processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

4.4 ANÁLISE DE UMIDADE

A análise do teor de umidade foi realizada com cerca de 1,0 g de sólido fermentado em analisador de umidade Shimadzu Moc63u, cujo funcionamento de baseia no método gravimétrico. A água presente na amostra é evaporada rapidamente pelo aquecimento de uma lâmpada de halogênio e a diferença entre a massa inicial e a massa final da amostra utilizada para calcular a porcentagem de umidade na amostra, em base úmida, conforme Equação 4. O percentual é apresentado diretamente na tela do aparelho, ao final da medição.

$$U = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde U é o teor de umidade na amostra (%), $m_{inicial}$ é a massa da amostra úmida e m_{final} é a massa da amostra seca.

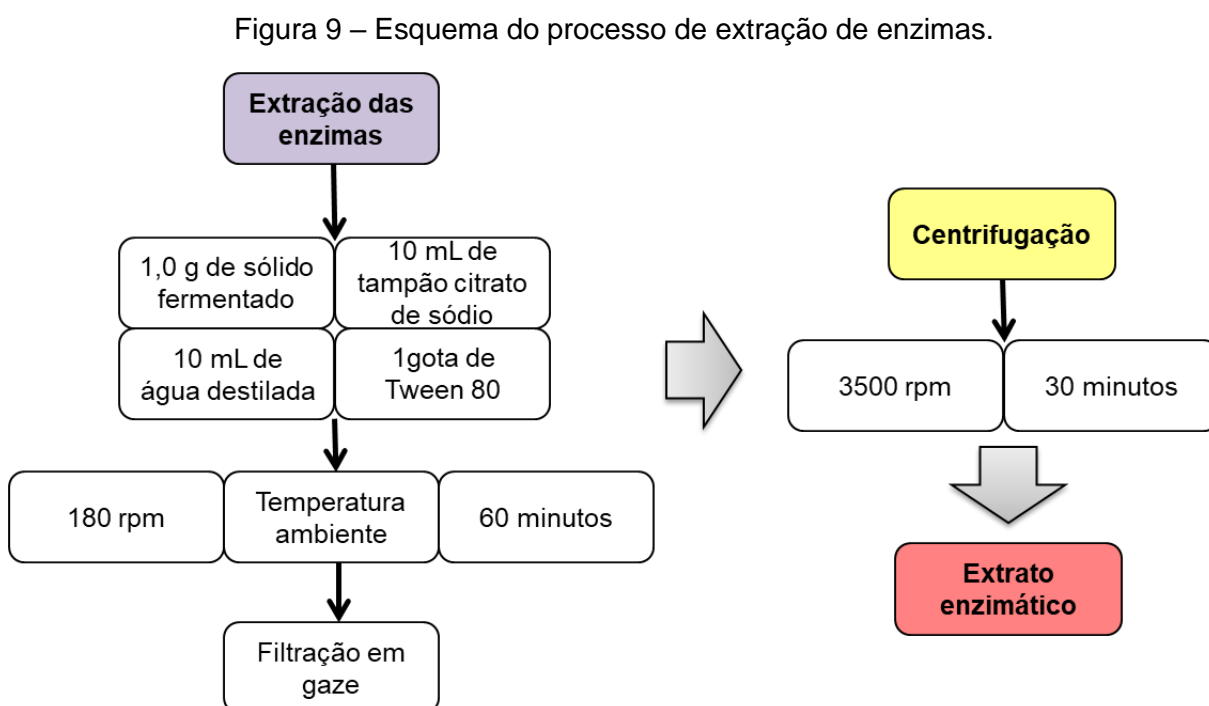
4.5 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS

A solução de extração é constituído de uma mistura 1:1 de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8) e água destilada (KILIKIAN *et al.*, 2014). O tampão foi preparado com 9,6 g de ácido cítrico anidro, adicionou-se cerca de 800 mL de água destilada e corrigiu-se o pH para 4,8 com hidróxido de sódio (NaOH) sólido e, por fim, o volume foi completado para 1000 mL.

Para a extração, aproximadamente 1,0 g do sólido fermentado foi adicionado em erlenmeyers de 125 mL, juntamente 20 mL da solução de extração mais uma gota de Tween 80. Os frascos foram submetidos à agitação de 180 rpm em mesa agitadora (SPLabor, 180/A) e temperatura ambiente durante 60 minutos (KILIKIAN *et al.*, 2014).

Após o tempo de agitação, a mistura foi filtrada em gaze para remoção dos sólidos e o extrato enzimático foi centrifugado (Centrífuga Nova Instruments, NT 810) a 3500 rpm durante 30 minutos (SALOMÃO, 2017). O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

A Figura 9 mostra um esquema das etapas da extração de celulases, até a obtenção do extrato enzimático.



4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FPASE

A atividade enzimática é representada em termos de U, que significa a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcares redutores por minuto na reação de hidrólise do substrato. Neste trabalho, as atividades serão expressas em U por grama de massa seca (U/gms).

Para determinar a atividade de FPase, utilizou-se como substrato da reação enzimática tiras de papel filtro Whatman nº1, com dimensões de 1,0 x 6,0 cm, que correspondem a aproximadamente 50 mg (GHOSE, 1987).

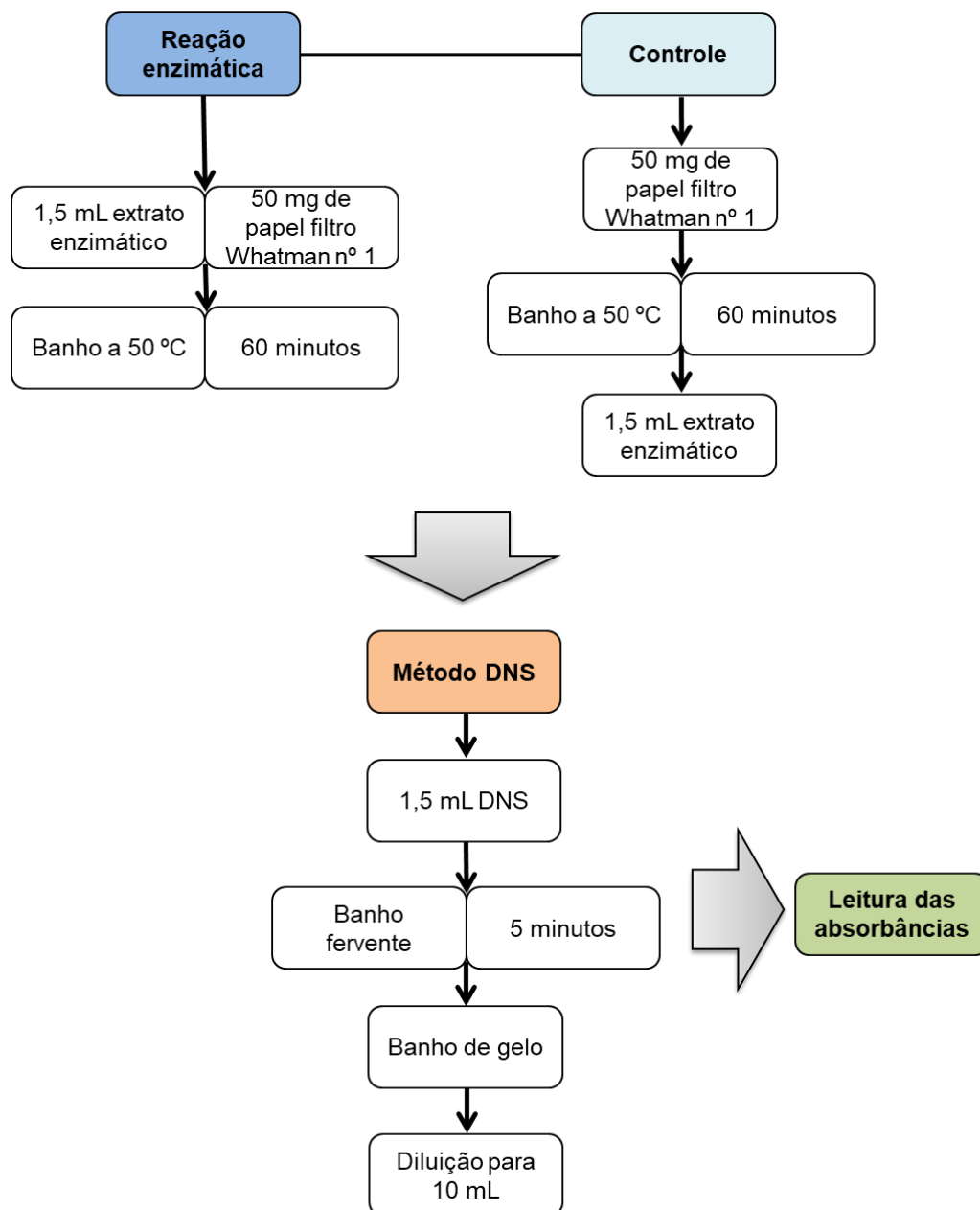
Em um tubo de ensaio foram adicionados 1,5 mL do extrato enzimático e o substrato enrolado, com o objetivo de se mantê-lo completamente submerso. Para o controle, apenas o substrato foi adicionado a outro tubo de ensaio. Os dois sistemas foram mantidos em banho termostático a 50 °C por 60 minutos. Após esse tempo, 1,5 mL do extrato enzimático foram adicionados ao tubo referente ao controle.

Fez-se ainda uma solução “branca”, utilizada para zerar o espectrofotômetro, para ambas as situações descritas e da mesma maneira, porém o extrato enzimático foi substituído por tampão citrato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8).

Decorrido o tempo da reação enzimática, realizou-se a determinação dos açúcares redutores, pelo método DNS (MILLER, 1959). Foram adicionados 1,5 mL de DNS aos tubos de ensaio, os quais foram submetidos a banho de água fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo, a fim de interromper a reação. O volume foi completado com água destilada até 10 mL, a mistura foi homogeneizada e sua absorbância lida em espectrofotômetro (Kasuaki IL 227) com comprimento de onda ajustado em 540 nm (GHOSE, 1987).

Um esquema dos processos envolvidos na determinação da atividade enzimática FPase é apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Esquema das etapas da determinação da atividade enzimática FPase.



4.6.1 Preparo da solução e curva padrão do DNS

O reagente DNS foi preparado com 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de uma solução de NaOH 2,0 mol/L. Essa mistura foi adicionada a uma solução de 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos em 500 mL de água destilada, sob aquecimento e agitação constantes. Após resfriamento, o volume foi aferido para 1000 mL (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Para converter as absorbâncias lidas no espectrofotômetro em concentrações de glicose e calcular as atividades enzimáticas, fez-se a curva padrão do DNS. Amostras de glicose com concentrações conhecidas foram submetidas ao método DNS e as absorbâncias obtidas foram relacionadas a essas concentrações em um gráfico. Traçou-se a reta de tendência, em que a equação correspondente foi utilizada para determinar a concentração de glicose obtida na reação enzimática.

As soluções de glicose foram preparadas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 g/L. Em tubos de ensaio, adicionou-se uma alíquota de 1,0 mL dessas soluções e 1,5 mL de DNS (AFONSO, 2012). Os tubos foram mantidos em banho fervente por 5 minutos seguido de banho de gelo. O volume dos tubos foi diluído com água destilada para 10 mL e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Kasuaki IL 227) a 540 nm.

4.7 CULTIVOS EM COLUNAS DE RAIMBAULT

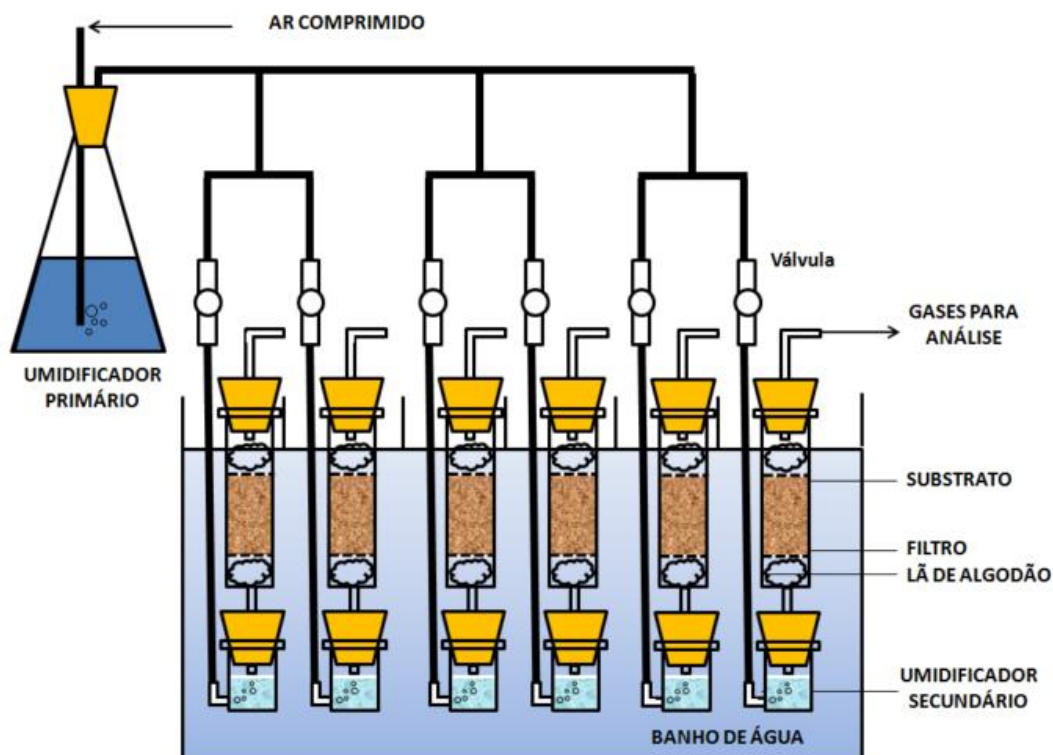
4.7.1 *Aparato experimental*

Os reatores tipo colunas de Raimbault são fabricados em vidro, possuem diâmetro de interno de 35 mm e comprimento útil de 150 mm. Um sistema foi montado com as colunas submersas em banho termostático com manutenção da temperatura em 30 °C, a qual foi mantida por um controlador tipo liga/ desliga associado a um aquecedor. Uma bomba de aquário foi utilizada para realizar a circulação de água e homogeneizar a temperatura dentro do banho.

O meio sólido foi oxigenado por um sistema de aeração forçada, em que o ar era fornecido por um compressor, com ajuste da vazão suficiente para realizar a distribuição para todas as colunas. O ar fornecido passava por um fluxômetro para controlar essa vazão, em seguida pelo umidificador primário e por um distribuidor de ar com válvulas, capazes de controlar a vazão de ar desejada, e seguia para cada coluna individualmente. Existe ainda um umidificador secundário, localizado no

fundo de cada coluna, por onde o ar entra, em seguida passa pelo substrato contendo o microrganismo e sai para o ambiente pelo topo da coluna. A Figura 12 apresenta um esquema do sistema montado para as fermentações com as colunas de Rimbault.

Figura 11 – Esquema do sistema de colunas de Rimbault.



Fonte: AFONSO (2012).

4.7.2 Estudo da influência da aeração na produção de celulasas

A fim de verificar a influência da aeração forçada na produção de celulasas, foram realizados ensaios com meio sólido composto por FT e BC, na proporção 40:60 e 60% de umidade inicial, com as duas linhagens de *T. harzianum* disponíveis (KILIKIAN *et al.*, 2014). Cerca de 4,0 g de meio sólido foram adicionados a um béquer de 150 mL juntamente com uma parte do volume de solução salina necessário para obter a umidade inicial desejada, sendo a outra parte do volume utilizada para diluir 0,1 g do inóculo. Após a inoculação, o meio foi homogeneizado e transferido para as colunas, contendo algodão e gaze tanto no fundo, para dar

suporte ao meio sólido e filtrar o ar que entrava, como no topo, impedindo que o meio e os microrganismos fossem carreados para fora da coluna.

As colunas foram conectadas ao sistema de aeração e mantidas em banho com temperatura de 30 °C durante 120 horas. A cada 24 horas de cultivo uma das colunas foi retirada do sistema para realização da extração das enzimas e análise de umidade. O extrato enzimático foi utilizado para determinação das atividades de FPase.

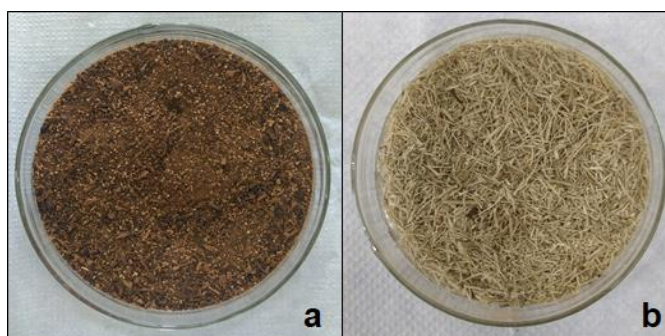
A título de comparação, também foram realizados cultivos em frascos, empregando-se as mesmas condições de fermentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SUBSTRATO E MICRORGANISMOS

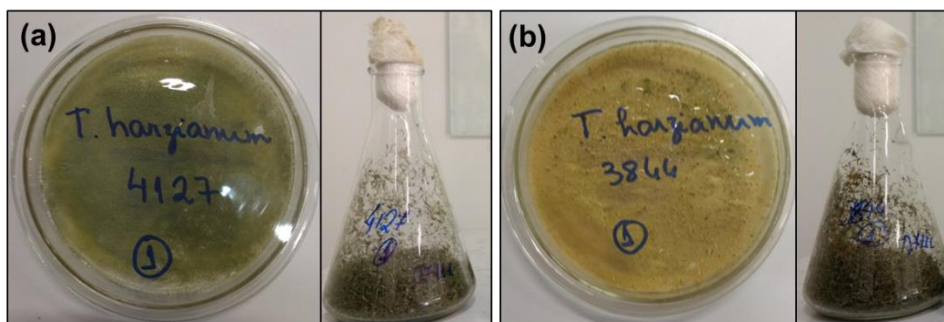
Os materiais utilizados nas fermentações passaram pelos procedimentos descritos no item 4.1 e foram armazenados em sacolas plásticas para posterior uso. A Figura 12 ilustra a casca de cacau (a) e o bagaço de cana (b) prontos para serem utilizados nas fermentações.

Figura 12 – Matéria-prima utilizada nos cultivos em estado sólido para a produção de celulasas: (a) casca de cacau e (b) bagaço de cana-de-açúcar.



Os microrganismos foram recebidos na forma liofilizada e foram cultivados em placas de Petri e, posteriormente, o conteúdo das placas foi transferido para o meio sólido, constituindo os estoques. A Figura 13 mostra os microrganismos nos dois momentos citados, após os sete dias de incubação.

Figura 13 – Cultivos das linhagens (a) *T. harzianum* IOC-4127 e (b) *T. harzianum* IOC-3844 em placa de Petri, com meio PDA e o estoque em frasco, com FT e BC.



Os esporos formados nos cultivos sólidos para o estoque foram contados pelo método da câmara de Neubauer, a fim de determinar o inóculo para os cultivos subsequentes. Pela Equação 2, foram contabilizados aproximadamente 3×10^{11} esporos/ g e 5×10^{11} esporos/ g para as linhagens IOC-4127 e IOC-3844, respectivamente. Uma vez que foram utilizados 0,1 g de inóculo em 10 g de meio sólido nos cultivos, conseqüentemente foi empregado um inóculo contendo em torno de 10^9 esporos/ g de substrato.

5.2 CULTIVOS SÓLIDOS EM FRASCOS

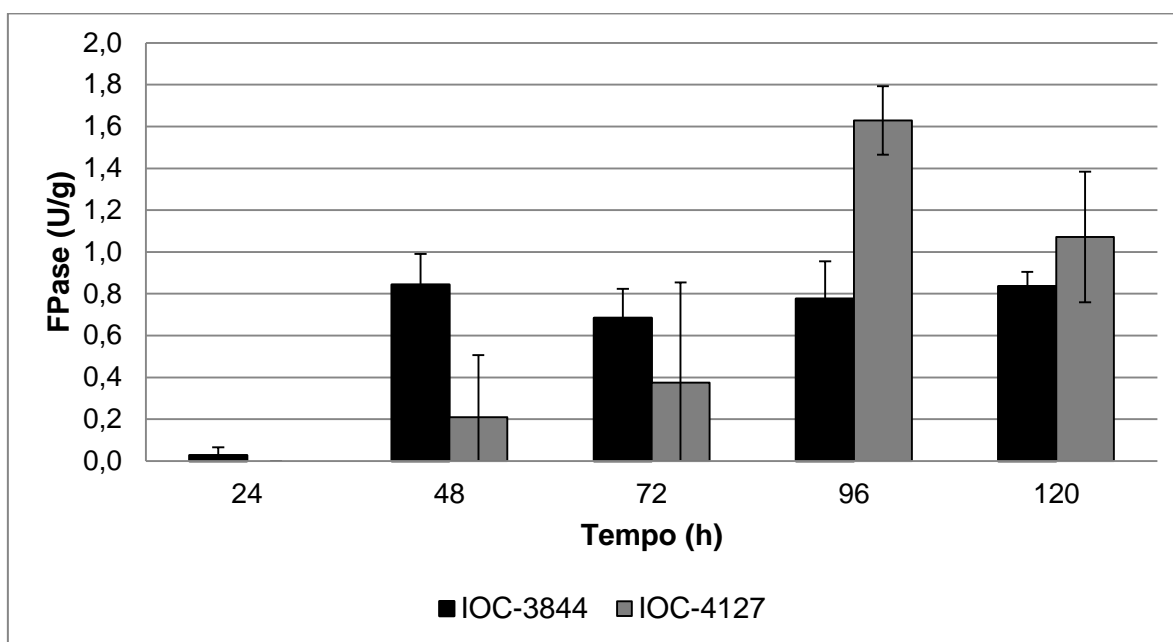
5.2.1 Estudo do microrganismo

Inicialmente, foram realizados cultivos com a finalidade de verificar qual das linhagens de *T. harzianum* seria a mais promissora para a produção de celulasas com biomassa de cacau como substrato, em termos de atividade enzimática FPase.

Kilikian *et al.* (2014) encontraram as maiores atividades enzimáticas para o cultivo de *T. harzianum* com meio sólido composto por 40:60 (FT:BC) e 60% de umidade inicial, decidiu-se então por utilizar a mesma proporção, substituindo o FT por CC. Assim, utilizou-se a composição 40:60 (CC:BC) e 60% de umidade inicial e a extração das enzimas em proporção sólido-líquido 1:20 durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados em duplicata e o erro utilizado foi o desvio padrão.

A Figura 14 esboça a média obtida nas duplicatas de atividade FPase para esses ensaios, bem como o erro das medidas, no decorrer do tempo de fermentação, para as linhagens IOC-4127 e IOC-3844.

Figura 14 – Cinética da atividade enzimática FPase para *T. harzianum* IOC-4127 (cinza) e *T. harzianum* IOC-3844 (preto) com 40% de CC e 60% de umidade inicial.



O gráfico de cinética de produção de celulases indicou que nas primeiras 24 horas ambas as linhagens produziram uma quantidade desprezível de enzimas, com valor praticamente nulo. Em 48 horas, a linhagem IOC-3844 apresentou atividade enzimática de $0,84 \pm 0,15$ U/gms, valor superior ao da outra linhagem, correspondente ao seu valor máximo. Após 72 horas, embora a atividade FPase da linhagem IOC-4127 tenha aumentado, a linhagem IOC-3844 ainda apresentava valor superior para a atividade enzimática, a qual permaneceu praticamente inalterada em relação às 48 horas e seguiu assim até 120 horas de fermentação. Em 96 horas, a atividade da linhagem IOC-4127 alcançou $1,63 \pm 0,16$ U/gms, seu valor máximo, correspondendo a aproximadamente o dobro da FPase obtido para a linhagem IOC-3844 nesse mesmo tempo de fermentação. Em 120 horas a atividade da linhagem IOC-4127 reduziu, porém ainda se apresentou superior à atividade alcançada pela linhagem IOC-3844.

Em suma, a atividade FPase da linhagem IOC-3844 aumentou mais rapidamente, permanecendo estatisticamente inalterada a partir de 48 horas de fermentação, uma vez que as medidas se encontraram dentro da faixa de erro umas das outras. Por outro lado, a linhagem IOC-4127 apresentou aumento gradativo nas atividades enzimáticas, sendo valores estatisticamente equivalentes em 24, 48 e 72 horas e, em 96 horas, a atividade FPase foi consideravelmente superior às demais. Dentre os

microrganismos, as atividades enzimáticas obtidas em 24, 72 e 120 horas, foram estatisticamente equivalentes.

A atividade celulolítica aumentou com o tempo de fermentação, até o seu máximo, ponto no qual possivelmente o microrganismo entrou na fase estacionária de crescimento. Após esse período, ocorreu diminuição na atividade FPase, que pode estar relacionada a mudanças nas condições do meio de cultivo, juntamente com a limitação da concentração de nutrientes no meio e a formação de subprodutos. Assim, pode ocorrer a morte celular e posterior desnaturação de enzimas, reduzindo a atividade enzimática (HAQ *et al.*, 2006; OBEROI *et al.*, 2008).

Esses resultados estão consideravelmente abaixo das atividades enzimáticas FPase máximas de 8,2 FPA/g alcançada por Alam *et al.* (2009), 5,4 U/gms obtida por Kilikian *et al.* (2014) e 6,25 U/g encontrada por Rahnema *et al.* (2016). Embora esses autores tenham utilizado o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* em FES, foram empregados substratos diferentes em suas fermentações.

Como consequência dos resultados apresentados, a linhagem IOC-4127 foi selecionada para os experimentos subsequentes, uma vez que esta apresentou atividade enzimática FPase 1,94 vezes maior do que a linhagem IOC-3844.

5.2.2 Estudo da umidade e da composição do meio sólido

A partir da cinética de produção de enzimas celulolíticas ao longo de 120 horas de cultivo, verificou-se na Tabela 7 que os maiores valores de atividade enzimática FPase em 120 horas de fermentação foram obtidos para os experimentos 5 e 6. A atividade enzimática máxima foi de 1,85 U/gms, no experimento 5, utilizando 60% de casca de cacau e 70% de umidade inicial, após 120 horas de fermentação.

Além disso, foi possível constatar que os experimentos com umidade inicial nos níveis mais baixos não favoreceram a produção de celulases. No entanto, conforme a umidade inicial foi aumentada, observou-se que a atividade enzimática FPase também aumentou. Segundo Pandey (2003) e Farinas (2015), a limitação de água no meio de cultivo pode causar dificuldade de acesso aos nutrientes, resultando em

uma redução na taxa de crescimento microbiano e na formação de produtos desejados.

Com relação ao teor de casca de cacau, a observação inicial dos resultados não possibilitou chegar a conclusões sobre a sua influência na atividade enzimática FPase. Assim, é necessário utilizar os resultados das análises estatísticas para verificar a influência dessa variável na produção de celulases.

Tabela 7 – Atividades enzimáticas FPase máximas obtidas no planejamento experimental para a fermentação em 120 horas de cultivo.

Experimento	CC (%)	Umidade (%)	FPase (U/gms)
1	-1 (40)	-1 (50)	0,52
2	+1 (60)	-1 (50)	0,63
3	0 (50)	-1 (50)	0,19
4	-1 (40)	+1 (70)	0,92
5	+1 (60)	+1 (70)	1,85
6	0 (50)	+1 (70)	1,62
7	-1 (40)	0 (60)	1,07
8	+1 (60)	0 (60)	0,74
9	0 (50)	0 (60)	0,47
10	0 (50)	0 (60)	0,61
11	0 (50)	0 (60)	1,03

5.2.2.1 Análises estatísticas

Para uma apreciação mais consolidada dos dados experimentais observados, foram realizadas algumas análises estatísticas em *software* para avaliar a influência dos fatores do planejamento e de suas combinações nas atividades enzimáticas. Essas análises foram realizadas para o tempo de fermentação fixo em 120 horas, uma vez que a maior parte das atividades FPase máximas foram obtidas nesse tempo.

Inicialmente, foi proposto para ajuste dos dados, um modelo composto pelos fatores individuais lineares e quadráticos, bem como combinações desses fatores. Os efeitos foram sendo removidos do modelo um a um, iniciando por aqueles que possuíam maior p-valor, até que se obteve o maior valor de R^2 ajustado. Rodrigues e lemma (2005) afirmam que existem divergências sobre a realização desse procedimento, porém cabe ao analisador verificar a influência desse método nos outros fatores. Como não se observou mudança significativa nos demais fatores mediante a realização desse método, então esse procedimento foi empregado para a determinação do modelo empírico.

A primeira análise foi realizada com a Tabela 8, que apresenta os efeitos de cada fator e das suas interações que foram mantidos no modelo estatístico.

Tabela 8 – Tabela dos efeitos dos fatores e das duas interações que foram mantidos no modelo estatístico.

Fatores	Efeitos	Desvio-padrão	p-valor
Média*	0,898740	0,072821	0,000248
(1) Umidade (L)*	1,013918	0,191604	0,006121
(2) CC (L)	0,235476	0,191604	0,286436
CC (Q)	-0,171861	0,142097	0,293078
Interação 1L x 2L	0,408259	0,234666	0,156884
Interação 1L x 2Q	0,310891	0,203226	0,200812
Interação 1Q x 2L	-0,424899	0,203226	0,104740

* significativo ($p < 0,05$). L: linear; Q:quadrático.

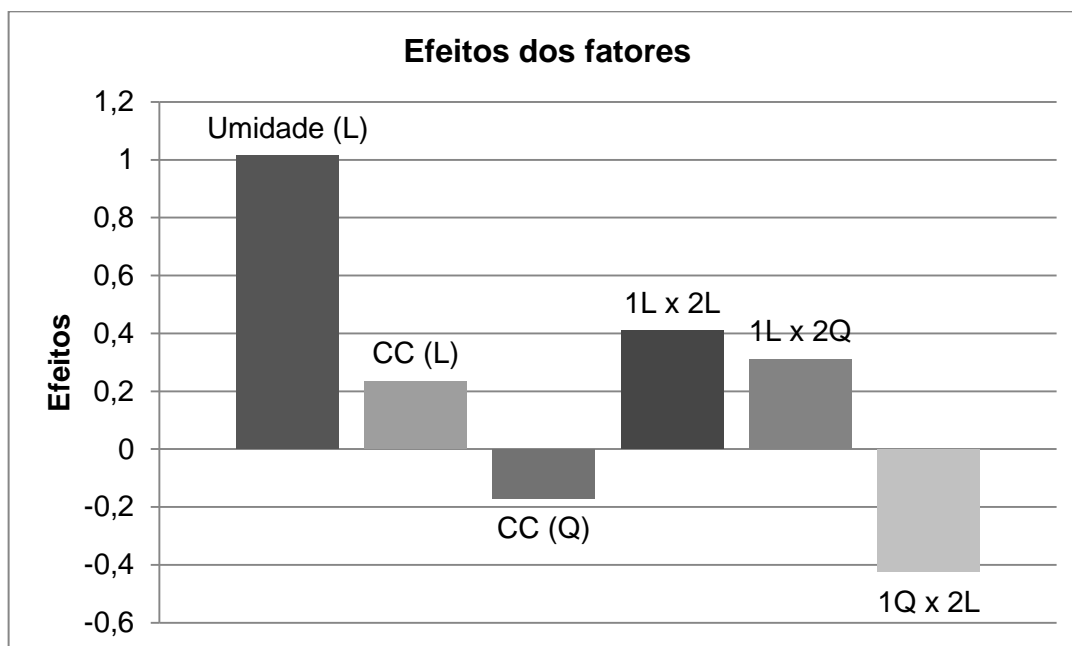
Verificou-se, pelo nível de significância de 5%, que os efeitos estatisticamente significativos para o modelo da FPase corresponderam apenas à média dos valores de atividade enzimática e ao fator umidade linear. Isso significa que esses termos são os fatores principais que influenciaram na atividade FPase. De acordo com o valor dos efeitos, foi possível identificar que a umidade influenciou positivamente na atividade enzimática, portanto aumentar teor de umidade implica no aumento da variável de resposta, FPase.

Os demais fatores não apresentaram significância estatística, porém foram mantidos no modelo já que assim se obteve o valor de 0,77636 para R^2 ajustado. Portanto, o modelo estatístico é capaz de elucidar 77,63% da variação de FPase (HU *et al.*, 2018). Com isso, o ajuste foi considerado satisfatório, visto que na

produção de celulases por FES estão envolvidos fatores naturais, como o substrato e o microrganismo, e a heterogeneidade do meio, sob os quais é difícil ter um controle rigoroso durante os experimentos.

A Figura 15 apresenta os efeitos da Tabela 8 de forma gráfica, evidenciando a influência da umidade consideravelmente superior aos demais fatores.

Figura 15 – Efeitos dos fatores na atividade enzimática FPase.



A fim de consolidar a significância estatística da regressão, foi construída a tabela de análise de variância (ANOVA), que corresponde à Tabela 9.

Tabela 9 – Tabela Anova ao nível de 5% de significância para atividade de FP no quinto dia.

Fatores	GL	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	6	2,242037	0,373673	6,78*	6,16
Resíduos	4	0,220272	0,055068		
Falta de ajuste	2	0,055677	0,027839	0,338 ^{n.s}	19,0
Erro Puro	2	0,164594	0,082297		
Total	10	2,462308			

* Significativo ($p < 0,05$); n.s: Não significativo ($p > 0,05$); GL: graus de liberdade.

Pelo teste F ao nível de significância de 5%, um fator é considerado estatisticamente significativo se o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior que o de F_{tabelado} (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; RODRIGUES; IEMMA, 2005). Dessa maneira, a Tabela 9 mostra que a regressão é estatisticamente significativa, uma vez que o valor de F calculado foi maior que F tabelado ($6,78 > 6,16$). Além disso, a falta de ajuste do modelo em relação aos dados experimentais se mostrou não significativa, já que o F calculado foi menor que o F tabelado ($0,338 < 19,0$).

Com isso, considerou-se que o modelo estatístico explanou suficientemente bem os dados experimentais. Consequentemente, a Equação 5, que representa o modelo codificado (fatores com os valores de -1, 0, +1), pode ser usada para prever a resposta para qualquer combinação de fatores dentro da faixa estudada (MANDAL; GOSH, 2018; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

$$Y = 0,898740 + 0,506959 \cdot x_1 + 0,117738 \cdot x_2 - 0,085931 \cdot x_2^2 + 0,204130 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,155445 \cdot x_1 \cdot x_2^2 - 0,212449 \cdot x_1^2 \cdot x_2 \quad (5)$$

Onde Y é a variável de resposta, correspondente à atividade FPase, que sofre interferência pelos fatores x_1 e x_2 , consoantes à umidade e à concentração de casca de cacau codificadas, respectivamente, bem como por suas combinações.

As Figuras 16 e 17 apresentam a superfície de resposta e a curva de nível, respectivamente, geradas com o intuito de averiguar a interação entre o teor de umidade e a proporção de casca de cacau na FES e encontrar a solução ótima a produção de celulasas, considerando a atividade FPase.

Figura 16 – Superfície de resposta para a interação do teor de umidade (x_1) e composição de casca de cacau (x_2) no meio sólido.

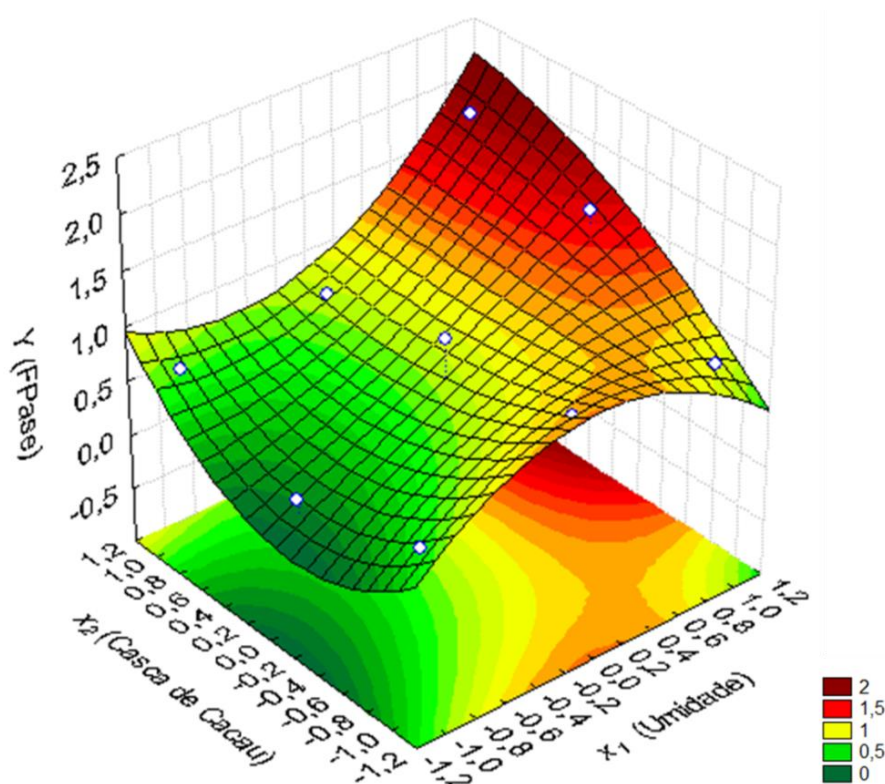
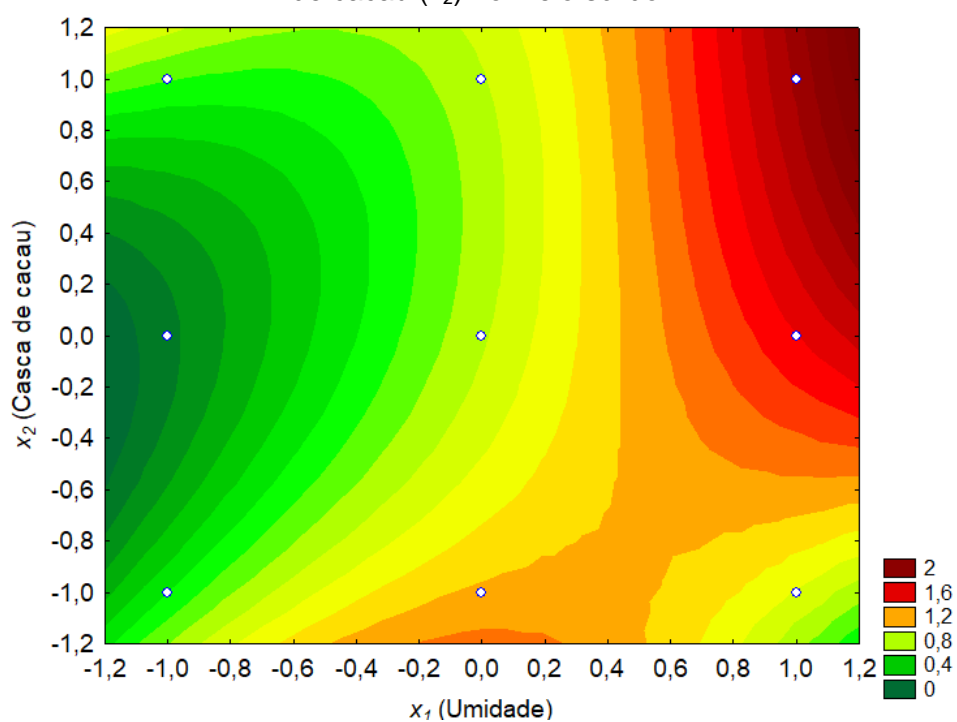


Figura 17 – Curva de nível para a interação do teor de umidade (x_1) e composição de casca de cacau (x_2) no meio sólido.



Avaliando a superfície formada, juntamente com a curva de nível, constatou-se que com 40% de CC ($x_2 = -1$) a atividade enzimática aumentou pouco, independente do teor de umidade inicial. Conforme a concentração de CC é aumentada, a atividade FPase também mudou muito pouco. No entanto, quando o teor de umidade também foi elevado, a resposta FPase aumentou consideravelmente, atingindo seu valor máximo (1,85 U/gms) nos níveis máximos do planejamento ($x_1 = +1$ e $x_2 = +1$), ou seja, 60% de CC e 70% de umidade inicial.

Com essas ponderações, ficou evidente que ensaios com teores de umidade maiores do que 70% possibilitem a obtenção de atividades enzimáticas FPase superiores às aquelas observadas nos ensaios realizados. Em relação à concentração de CC, constatou-se que em concentrações mais elevadas de CC a atividade enzimática de FPase apresentou maior valor. Contudo baseado nos efeitos da Tabela 8 e na tendência das Figuras 16 e 17, não há indícios de que aumentar a proporção de CC no meio sólido acarretaria em aumento significativo da atividade FPase, uma vez que a umidade apresentou uma influência bastante superior.

Deschamps *et al.* (1985) utilizaram palha e farelo de trigo para o cultivo de *T. harzianum* e estudaram a influência, dentre outros fatores, do teor de umidade inicial no meio sólido na produção de celulasas. Foi verificado que esta variável afeta significativamente a produção de celulasas, ocorrendo aumento na atividade de FPase quando a umidade passou de 55% para 74%, o que também foi observado neste trabalho, em que se obteve maior atividade FPase em 70% de umidade.

Almeida (2012) cultivou *T. reesei* em bagaço de cana tratado, a fim de estudar a alteração ocorrida nos resultados de atividade enzimática, variando o teor de umidade em 30, 50 e 70%. Conforme obtido nos ensaios deste trabalho com biomassa de cacau, a autora também constatou que a atividade de FPase aumentou proporcionalmente em relação à umidade, atingindo o valor máximo de 5,45 U/g.

Kupisk (2012) cultivou *T. reesei* e *Rhizopus oryzae* variando o teor de umidade e a quantidade de casca de arroz presente no meio sólido, a fim de verificar a influência desses fatores na atividade FPase. Para *T. reesei*, obteve-se a maior atividade FPase de 2,15 U/g, com 100% de casca de arroz e 50% de umidade inicial. Além disso, a autora verificou que apenas a variável umidade foi significativa, apresentando um efeito negativo na resposta de FPase. Já para *Rhizopus oryzae* a atividade FPase máxima foi obtida para o processo que utilizou 8,5% de casca de

arroz e 30% de umidade, alcançando 1,83 U/g. Neste caso, os fatores significativos foram o teor de casca de arroz, que apresentou efeito negativo na resposta, e a interação casca-umidade, com efeito positivo na atividade enzimática. As conclusões desse trabalho indicaram melhores resultados para teores de umidade mais baixos, diferente do que foi concluído neste trabalho.

Gasparotto (2014) avaliou o teor de umidade inicial (65 – 90%) e a concentração de farelo de soja (0 – 5,9%) no meio sólido para a produção de enzimas celulolíticas com *T. reesei*. Após vários ensaios, foi determinada a melhor condição em 68,6% de umidade e 0,9% de farelo de soja para produção de enzimas celulolíticas.

Oliveira *et al.* (2018) estudaram a influência da umidade e do pH na produção de celulasas com *Aspergillus fumigatus* em três resíduos lignocelulósicos diferentes. Em bagaço de cana foi encontrada a maior atividade enzimática FPase (0,64 U/gms) com 50% de umidade. Já para a casca de coco verde, a maior atividade FPase (0,28 U/gms) foi alcançada com 75% de umidade inicial e para o bagaço de caju com 70% de umidade foi obtido 0,26 U/gms. Dessa forma, é possível identificar que o teor de umidade ótimo está relacionado ao tipo de substrato utilizado, sendo os resultados com bagaço de cana diferentes dos obtidos neste trabalho. Já os ensaios com casca de coco e bagaço de caju apresentaram maiores atividades FPase com umidades próximas às deste trabalho.

Hu *et al.* (2018) investigaram a produção de celulasas por *Aspergillus niger* em resíduo têxtil avaliando diferentes parâmetros, dentre eles o teor de umidade. Foram realizadas fermentações variando a umidade entre 60 e 90%, alcançando 1,47 U/g, de atividade FPase com 80% de umidade. As superfícies de respostas geradas para cada duas variáveis indicaram aumento na atividade enzimática de FPase com o aumento da umidade. A condição ótima determinada pelo modelo estatístico foi com umidade de 78,53%, a qual foi testada e o valor de FPase foi confirmado experimentalmente.

Os fatos observados comprovam que a presença da água no meio de cultivo é um fator de suma importância tanto para o crescimento microbiano quanto para a excreção das enzimas de interesse (ALMEIDA, 2012). Além disso, observa-se que o teor de umidade ótimo para cada processo é dependente da natureza do material sólido, das necessidades do microrganismo e dos produtos desejados (PANDEY, 2000; HÖLKER; LENZ, 2005).

Além da observação referente à umidade, vale salientar que a atividade enzimática FPase máxima obtida neste trabalho é bastante próxima daqueles apresentados na literatura citada. Dessa forma, pode-se dizer que a utilização de casca de cacau como substrato de FES para produção de celulases utilizando *T.harzianum* apresentou resultados satisfatórios. Portanto, esse resíduo consiste em um potencial substituto para as fontes celulósicas mais comuns na produção de enzimas celulolíticas.

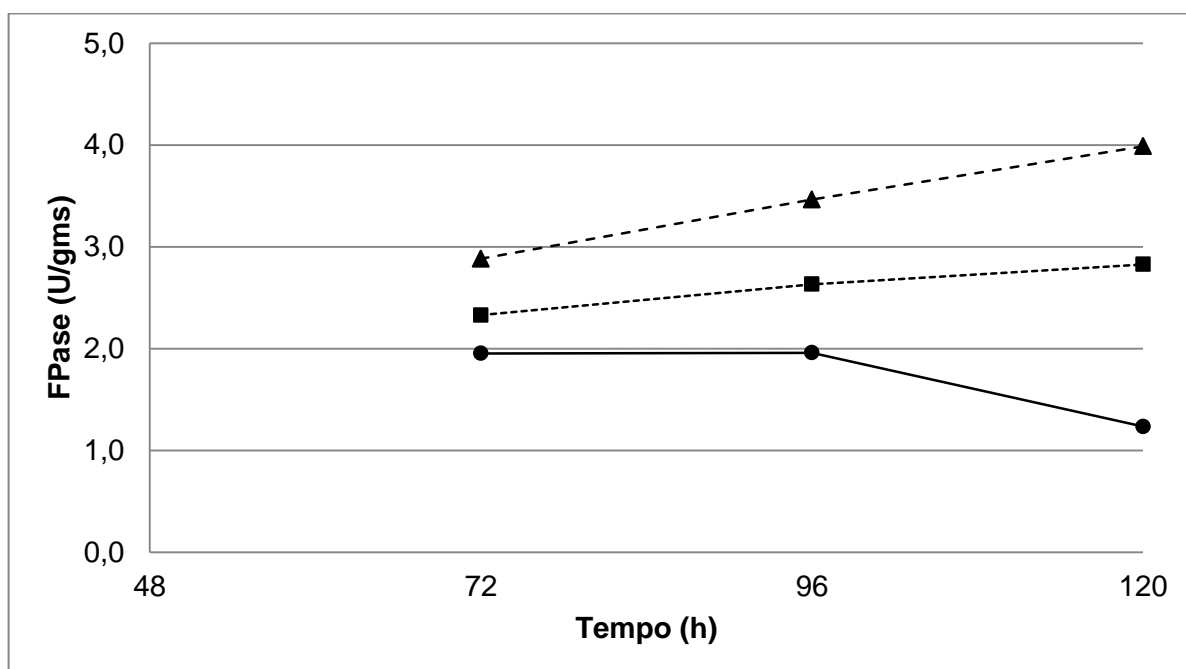
5.2.3 Avaliação de teores de umidade inicial mais elevados

Diante do exposto anteriormente, foram realizados ensaios em frascos com teores de umidade inicial maiores do que aqueles avaliados no planejamento experimental da fermentação, a fim de verificar se maiores atividades enzimáticas poderiam ser obtidas. Uma vez que a condição de 60:40 (CC:BC) apresentou o maior valor de atividade enzimática e uma tendência de ser ainda maior, de acordo com o aumento da umidade.

Foram realizados ensaios com umidade inicial de 70, 75 e 80% em 72, 96 e 120 horas de fermentação, por serem os tempos nos quais as maiores atividades enzimáticas de FPase foram observadas. Os resultados encontrados para esses ensaios estão apresentados na Figura 18.

Verificou-se que a atividade enzimática FPase atingiu níveis maiores, em comparação com os ensaios do planejamento, de acordo com o aumento da umidade inicial no meio sólido. O teor de umidade de 80% possibilitou a obtenção de 3,99 U/gms de atividade enzimática, em 120 horas de cultivo, correspondendo a um incremento de 2,15 vezes na atividade de FPase do melhor resultado. (MUDEI PRA ANTES DA FIGURA)

Figura 18 – Atividade enzimática FPase para cultivos com *T. harzianum* IOC-4127 nas condições de 60:40 (CC:BC) e (●) 70%, (■) 75% e (▲) 80% de umidade inicial.



Com isso, é possível que para teores de umidade inicial maiores seja alcançado mais um aumento na atividade enzimática, porém também pode ocorrer o oposto, uma redução significativa, conforme observado por Florencio (2011). A autora constatou aumento da atividade enzimática CMCase em cultivos de *T. reesei* RUT C30 com 75% e 80% de umidade inicial. Enquanto em cultivos com 85% ocorreu a diminuição da atividade de CMCase.

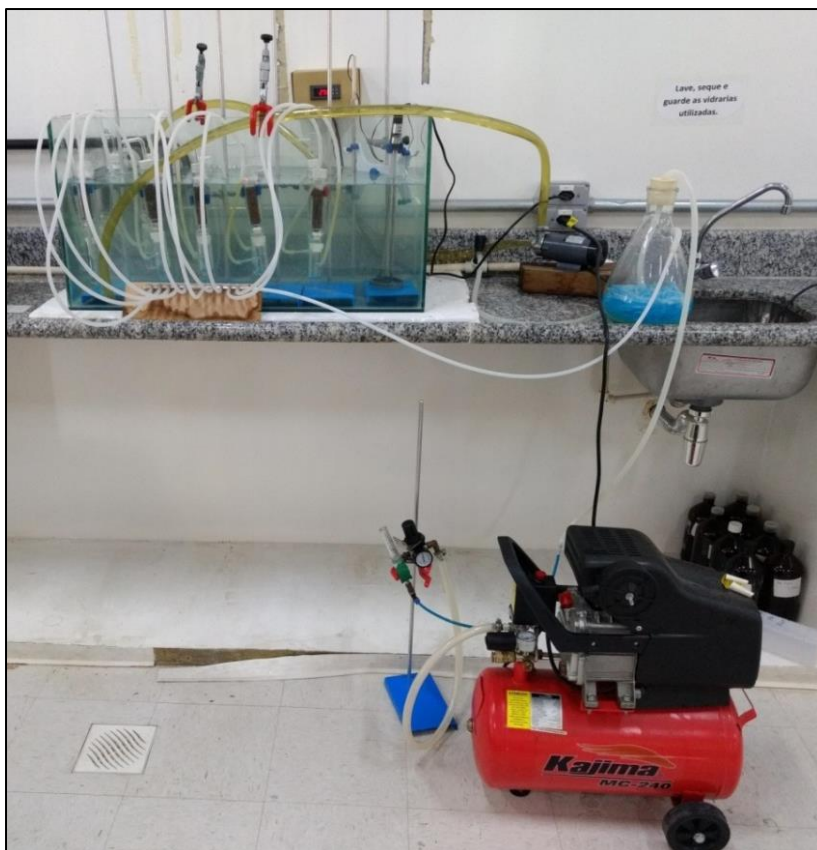
Assim, foi possível comprovar que o teor de umidade do meio é essencial para o crescimento do microrganismo e para a produção de celulasas, uma vez que afeta a difusão de nutrientes e de ar no meio de cultivo. Limitação de água no meio pode causar dificuldade de acesso aos nutrientes, resultando em uma redução na taxa de crescimento microbiano e na formação de produtos desejados. Por outro lado, teores de umidade elevados diminuem a porosidade do meio sólido, o que resulta em restrição da difusão de gases (FARINAS, 2015; PANDEY, 2003).

5.3 CULTIVOS SÓLIDOS EM COLUNAS DE RAIMBAULT

5.3.1 Aparato experimental

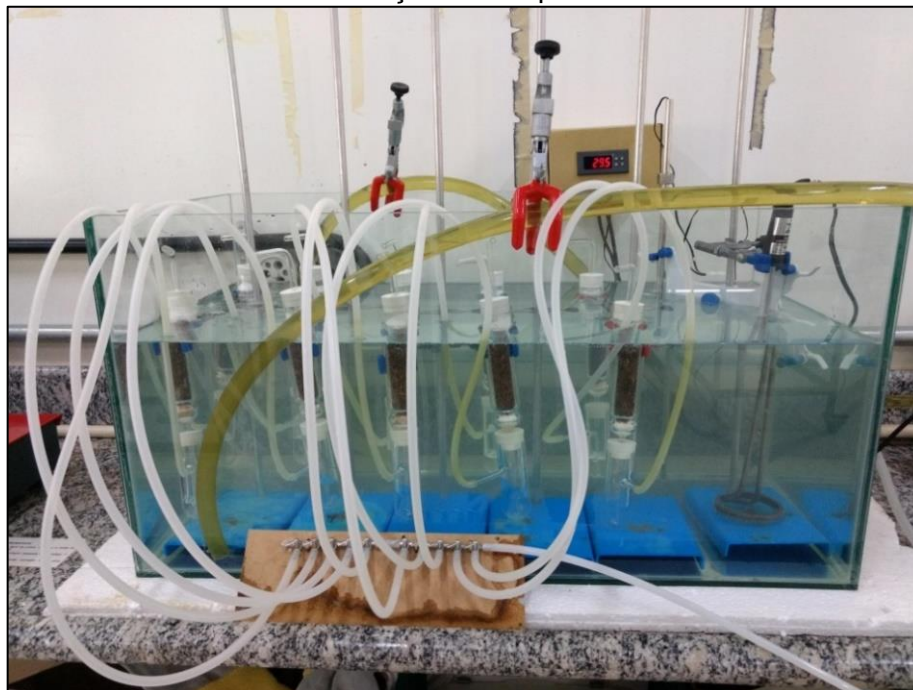
O sistema de colunas de Raimbault completo, utilizado para a produção de celulases por FES foi montado conforme item 4.7.1. A Figura 19 corresponde a esse sistema já em processo de fermentações. A Figura 20 apresenta o destaque para o banho termostático contendo as colunas.

Figura 19 – Sistema utilizado para a fermentação em colunas de Raimbault.



No umidificador primário foram adicionadas ponteiros juntamente com a água responsável por umidificar o ar que era fornecido para as colunas. A finalidade de aumentar a superfície de contato entre o ar e água e a turbulência, e assim favorecer a transferência de massa entre a água e o ar.

Figura 20 – Destaque para as colunas submersas no banho termostático utilizado para manutenção da temperatura.



Outra observação importante é o fato de que não se dispunha de fluxômetros capazes de medir a vazão do ar fornecido para as colunas, por isso, a visualização das bolhas no umidificador secundário foi utilizada como base para verificar a quantidade de ar fornecido para cada coluna. A aeração foi ajustada de maneira que se tivesse uma quantidade semelhante de bolhas por minuto em cada coluna, porém por se tratar de um método impreciso, não foi possível ajustar uma vazão exatamente igual em todas as colunas.

5.3.2 Comparação entre cultivos com aeração forçada e com aeração natural

A cinética da produção de celulasas em colunas de Raimbault empregando a aeração forçada foi realizada em FES utilizando *Trichoderma harzianum* IOC-3844 e IOC-4127 cultivados em FT e BC. A fim de verificar a influência da aeração na produção de celulasas, realizaram-se cultivos em frascos, mantendo-se as demais condições de fermentação, comparando-se os dois processos, por meio das atividades enzimáticas FPase.

5.3.2.1 *Trichoderma harzianum* IOC-4127

O crescimento microbiano ao longo do tempo de fermentação foi registrado e pode-se observar o aumento da presença dos micélios de 24 para 120 horas, sendo a Figura 21 para as colunas e a Figura 22 para os frascos, utilizando a linhagem IOC-4127.

Figura 21 – Crescimento microbiano para os cultivos de *T. harzianum* IOC-4127 em colunas após 24, 48, e 120 horas de fermentação.

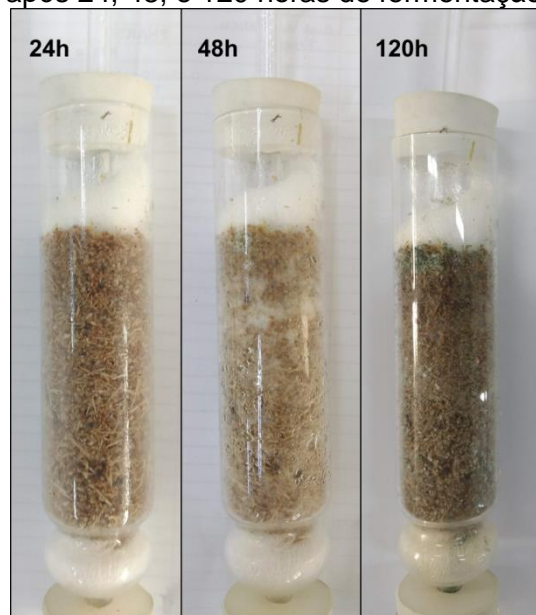
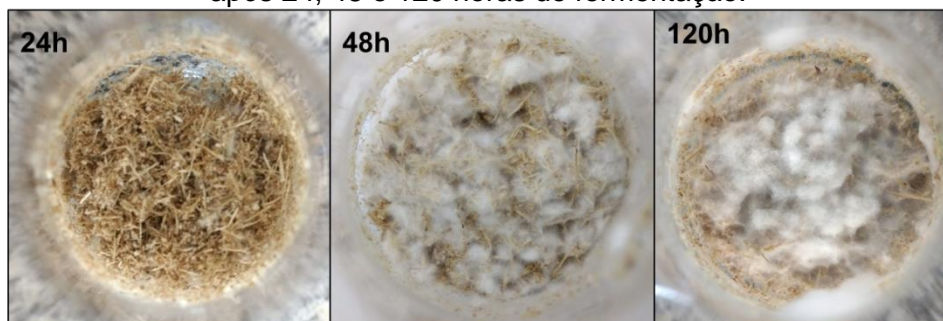


Figura 22 – Crescimento microbiano para os cultivos de *T. harzianum* IOC-4127 em frascos após 24, 48 e 120 horas de fermentação.

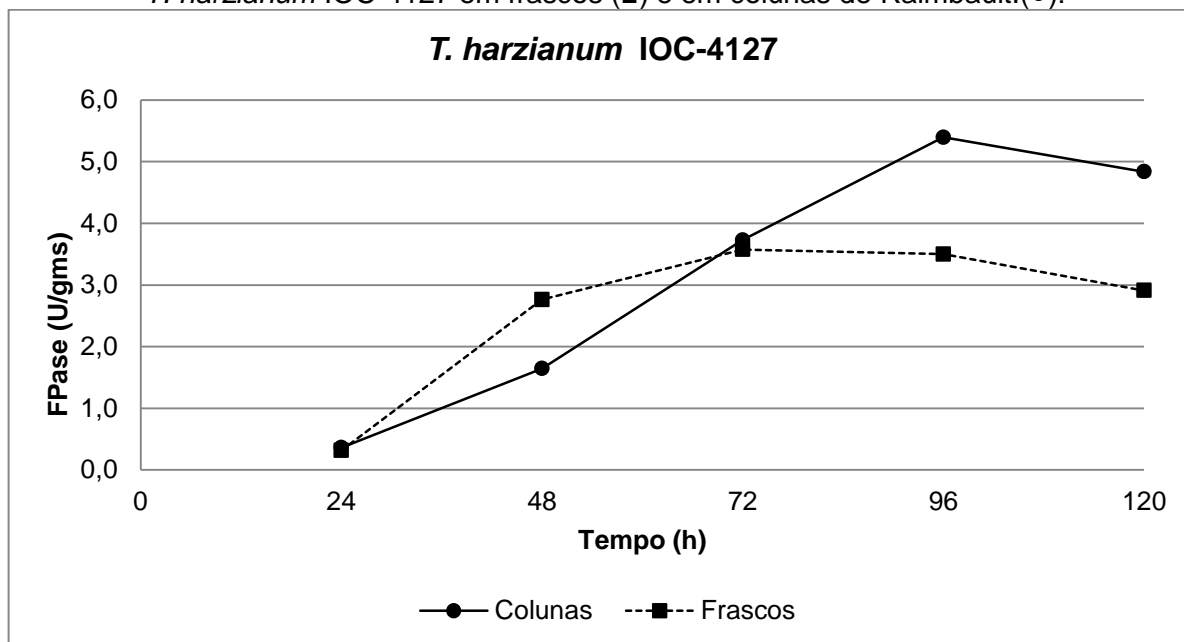


Nas fermentações em colunas, foi observada a presença de micélios a partir de 48 horas, conferindo a cor branca no meio. No período de 120 horas foi possível verificar a presença dos esporos, que apresentam coloração esverdeada. Já nos

cultivos em frascos, observou-se que desde as primeiras 24 horas houve a formação de micélios, os quais aumentaram de acordo com o tempo de fermentação. Ao final do cultivo se observou a grande quantidade de micélios presentes, porém não se constata a presença de esporos.

Além do aspecto visual, também foram constatadas diferenças significativas nas atividades enzimáticas FPase entre os sistemas estudados. Na Figura 23 são apresentados os valores obtidos para esses ensaios ao decorrer do tempo de cultivo.

Figura 23 – Comparação da atividade enzimática FPase em cultivos sólidos com *T. harzianum* IOC-4127 em frascos (■) e em colunas de Rimbault.(●).



O gráfico indicou que após 24 horas de fermentação a atividade enzimática teve valor semelhante para o cultivo em frascos e em colunas. Já em 48 horas de cultivo, o ensaio em frascos apresentou atividade enzimática maior do que o ensaio em colunas. Em 72 horas, novamente foram obtidos valores semelhantes para os dois processos estudados, sendo alcançado 3,57 U/gms de atividade enzimática FPase, a maior para o cultivo em frascos. Nos tempos de fermentação seguintes, as atividades obtidas nas colunas foram superiores às obtidas nos frascos, sendo o valor máximo 5,40 U/gms, em 96 horas de cultivo.

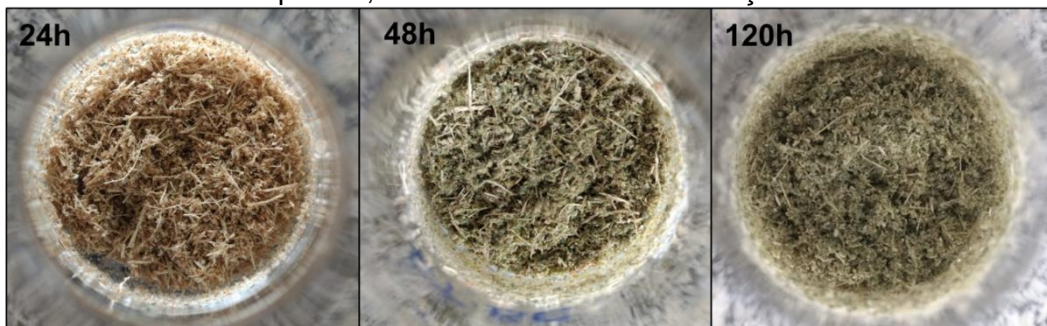
5.3.2.2 *Trichoderma harzianum* IOC-3844

Foram realizados ainda outros ensaios, tanto em colunas quanto em frascos, empregando as mesmas condições de fermentação, porém utilizando a linhagem IOC-3844. As Figuras 24 e 25 apresentam o aspecto visual das colunas e dos frascos, respectivamente, ao decorrer do tempo de fermentação.

Figura 24 – Crescimento microbiano para os cultivos de *T. harzianum* IOC-3844 em colunas após 24, 48 e 120 horas de fermentação.



Figura 25 – Crescimento microbiano para os cultivos de *T. harzianum* IOC-3844 em frascos após 24, 48 e 120 horas de fermentação.

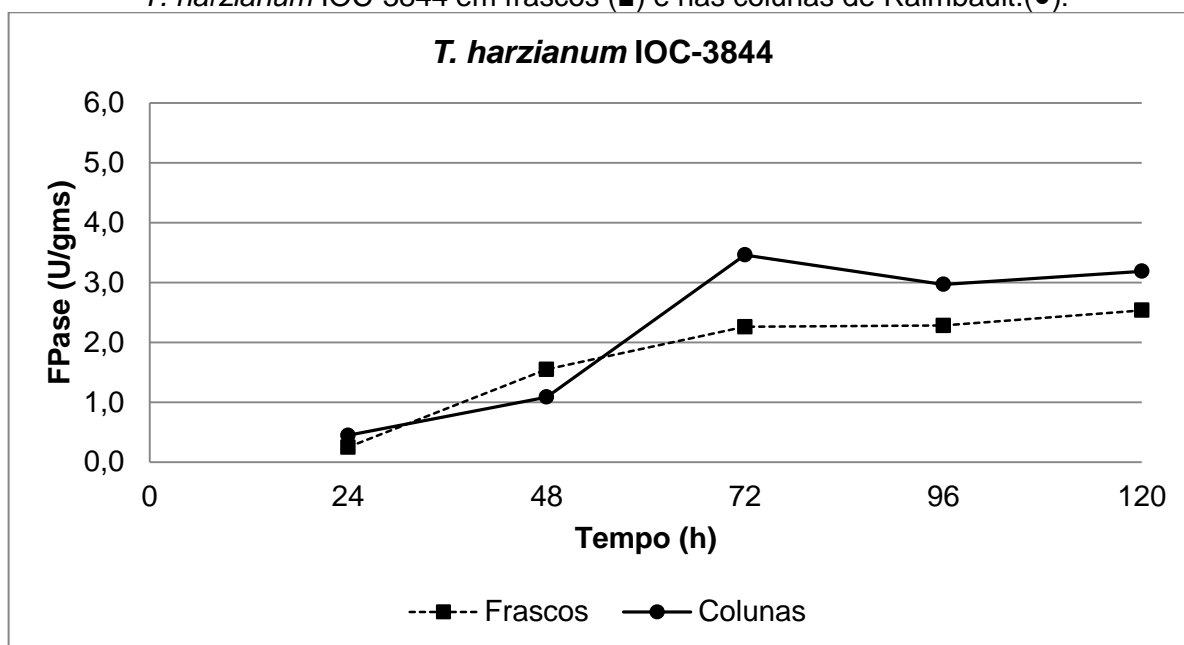


Nos ensaios utilizando colunas de Raimbault, foi possível verificar a presença de micélios após 48 horas de cultivo. A partir daí, observou-se a presença de esporos, os quais aumentam no meio sólido, com o decorrer da fermentação, o que pôde ser

constatado pela maior intensidade da coloração verde. Para os frascos, também se observou o crescimento microbiano após 48 horas de fermentação, tempo no qual é possível visualizar micélios e esporos.

Os valores obtidos para as atividades enzimáticas FPase entre os sistemas com aeração forçada e com aeração natural estudados para a linhagem IOC-3844, no decorrer do tempo de cultivo, estão apresentadas na Figura.26.

Figura 26 – Comparação da atividade enzimática FPase em cultivos sólidos com *T. harzianum* IOC-3844 em frascos (■) e nas colunas de Rimbault.(●).



Para essa linhagem de *T. harzianum*, observou-se um comportamento semelhante ao obtido para a linhagem IOC-4127 até 48 horas. O valor da atividade FPase nos ensaios em frascos e em colunas foi bastante próximo em 24 horas e em 48 horas a atividade enzimática dos cultivos em frascos foi superior à atividade encontrada nos cultivos em colunas. A partir de 72 horas de fermentação, os ensaios nas colunas apresentaram atividades enzimáticas maiores do que nos frascos. Em 72 horas de fermentação, a atividade enzimática atingiu 3,46 U/gms nos cultivos em colunas, sendo o maior valor observado para esse ensaio, enquanto os frascos apresentaram atividade enzimática de FPase de 2,54 U/gms, em 120 horas de cultivo.

5.3.2.3 Comparação entre os cultivos de *T.harzianum* IOC-4127 e IOC-3844

Os valores máximos de atividade enzimática FPase encontrados para as duas linhagens de *Trichoderma harzianum* nas fermentações em estado sólido aeradas e não aeradas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividades FPase máximas obtidas nos cultivos com aeração forçada e com aeração natural para *T. harzianum* IOC-4127 e IOC-3844.

Linhagem	Aeração forçada	Aeração natural
IOC-4127	5,40 U/gms	3,57 U/gms
IOC-3844	3,46 U/gms	2,54 U/gms

A atividade enzimática das duas linhagens aumentou nos cultivos realizados com as colunas de Raimbault, em relação aos frascos, apresentando um acréscimo de 51,3% para a linhagem IOC-4127 e de 36,2% para a linhagem IOC-3844. Provavelmente, isso pode ter ocorrido porque a aeração fornece o oxigênio necessário para a respiração celular e promove aumento da sua transferência entre as partículas sólidas (FARINAS, 2015).

Nos cultivos com aeração natural, a transferência de oxigênio ocorre principalmente por difusão, o que limita o oxigênio disponível para o crescimento microbiano (FARINAS *et al.*, 2011; GASPAROTTO, 2014; PIROTA *et al.*, 2016). Além disso, a aeração colabora com a manutenção da umidade no meio sólido, uma vez que o ar é saturado com água antes de entrar nas colunas (ROCKY-SALIMI; HAMIDI-ESTEFAHANI, 2010).

Ademais, a aeração também auxilia nas trocas térmicas, controlando a temperatura no meio de cultivo a partir da remoção do calor e, ainda, remove o gás carbônico, ambos produzidos durante o processo de respiração celular (GASPAROTTO, 2014; RAIMBAULT, 1998). Raghavarao *et al* (2003) afirma que em fermentações não aeradas, a remoção do calor metabólico é dificultada, devido a baixa condutividade térmica do substrato sólido e ao reduzido número de superfícies para troca térmica.

Uma comparação entre os microrganismos apontou que a linhagem IOC-4127 alcançou maiores níveis de atividade FPase, tanto nas fermentações aeradas

quanto naquelas não aeradas. Comparando-se as atividades FPase máximas alcançadas, verifica-se que a linhagem IOC-4127 produziu uma quantidade de enzimas 56,1% superior a linhagem IOC-3844. Dessa forma, fica evidente, como já observado no item 5.2.1, que a linhagem IOC-4127 é capaz de produzir maiores níveis de celulasas, em comparação com a linhagem IOC-3844.

Segundo a CCFF (Fiocruz) a diferença entre as linhagens estudadas advém do substrato dos quais foram isolados, bem como hospedeiros e regiões geográficas. Com isso, possivelmente a linhagem IOC-4127 apresentou maior adaptação aos meios sólidos estudados, com atividade enzimática mais pronunciada, o que promoveu a hidrólise da celulose presente no substrato e, conseqüentemente, maior crescimento celular. Já a linhagem IOC-3844 apresenta alta concentração de esporos, o que indica um meio de cultivo desfavorável para o crescimento microbiano.

Conforme os resultados apresentados, constatou-se que, em concordância com a literatura, a aeração forçada é um dos fatores que afetam diretamente a FES e, conseqüentemente, o crescimento microbiano e a produção de celulasas, uma vez que está relacionada à disponibilidade de oxigênio no meio. Em todos os casos da literatura aos quais se teve acesso, foram observados aumentos na produção enzimática em comparação aos cultivos utilizando aeração natural.

Rocky-Salimi e Hamidi-Estefahani (2010) estudaram o efeito do tamanho de partícula do substrato, a taxa de aeração e o tempo de cultivo, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei* e farelo de arroz como substrato. A atividade enzimática de FPase máxima obtida foi de 11,648 U/gms e os resultados indicaram que FPase foi fortemente sensível ao tamanho de partícula, à aeração e à combinação desses fatores.

Farinas *et al.* (2011) estudaram a influência do fluxo de ar, da umidade relativa do ar de aeração e do teor de umidade inicial do meio sólido na atividade enzimática CMCase, produzida por *Aspergillus niger* cultivado em farelo de trigo. Para os cultivos com aeração natural foi obtida atividade enzimática de 29,8 U/g, enquanto para os cultivos com aeração forçada alcançou-se 50,2 U/g de atividade CMCase, correspondendo a uma aumento de 68,5%.

Afonso (2012) cultivou *Myceliophthora sp.* em frascos e em colunas de Raimbault, utilizando farelo de soja e BC. Foi observado um alto teor de celulasas, em relação à

FPase, sedo obtido 10,3 U/gms nos cultivos com aeração natural e 13,0 U/gms em cultivos com aeração forçada. Embora esses valores sejam próximos ao dobro do valor obtido neste trabalho, ocorreu um aumento de apenas 26,2%.

Myceliophthora sp. também foi cultivado por Casciotori, Casciotori e Thomeo (2013), utilizando BC e FT como substratos. O biorreator de leito empacotado possuía aeração forçada, era em escala piloto, com 1 m de comprimento e a produção enzimática foi avaliada a cada 10 cm. Foram testadas duas taxas de aeração diferentes e a maior atividade obtida foi de 4,0 U/gms com aeração de 240 L/h. Quando a taxa de aeração é reduzida pela metade, a atividade enzimática FPase reduz para 3,0 U/gms, indicando baixa disponibilidade de oxigênio para o último caso.

Trichoderma reesei foi cultivado em BC e farelo de soja por Gasparotto (2014) e apresentou aumento na atividade FPase de 3,25 U/g nos cultivos com aeração estática para nos cultivos em colunas, empregando aeração forçada. Esse valor máximo corresponde 4,118 U/g a um valor inferior, bem como o aumento de 26,7% obtido pela autora está abaixo dos encontrados neste trabalho para a linhagem IOC-4127.

Pirota *et al.* (2016) cultivaram *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo e a aeração forçada possibilitou que fosse alcançado um aumento de 336% na atividade enzimática FPase, em relação aos cultivos com aeração estática, em um dos ensaios de teste. Embora tenha sido uma grande variação, o valor máximo da atividade enzimática foi inferior a 0,50 U/g, em qualquer cultivo, sendo consideravelmente abaixo do valor obtido neste trabalho.

A Tabela 11 apresenta a comparação entre as atividades FPase máximas obtidas para este trabalho e para outros autores citados, utilizando aeração forçada. As diferenças percentuais dessas atividades em relação aos cultivos estáticos também estão indicadas.

Tabela 11 – Comparação entre a atividade enzimática FPase com aeração forçada e o aumento em relação à fermentação não aerada, obtida por este trabalho e por outros autores

Referência	Fungo	Substrato	FPase	Aumento
Este trabalho	<i>T. harzianum</i> IOC-4127	FT e BC	5,40 U/gms	51,3%
Afonso (2012)	<i>Myceliophthora</i> sp.M77	BC e FS	13,0 U/gms	26,2%
Gasparotto (2014)	<i>T. reesei</i> NRRL-6156	BC e FS	4,12 U/g	26,7%
Pirota <i>et al.</i> (2016)	<i>A. oryzae</i> P27C3	FT	0,50 U/g	336%

FT: farelo de trigo, BC: bagaço de cana, FS: farelo de soja.

Diante desses dados, é possível afirmar que os resultados obtidos neste trabalho para o cultivo de *Trichoderma harzianum* em BC e FT foram satisfatórios. Os valores de atividade enzimática FPase e/ou o percentual de aumento obtidos dos cultivos utilizando aeração natural para os cultivos com aeração forçada se mostraram superiores aos resultados disponíveis na literatura, mesmo que para outros microrganismos, substratos e escala do biorreator.

6 CONCLUSÃO

A realização de FES para produção de celulases utilizando casca de cacau como substrato se mostrou um processo que pode ser desenvolvido, uma vez que se obtiveram valores razoáveis de atividade enzimática FPase. Ressalta-se que o uso desse substrato para produção de celulases é bastante escasso, o que evidencia relevância dos resultados obtidos neste trabalho.

Dentre os microrganismos avaliados, a linhagem IOC-4127 apresentou maiores valores de atividade enzimática para todos os experimentos, sendo indicada para outros estudos para produção de celulases.

O estudo das variações do teor de umidade e da proporção de casca de cacau nas fermentações realizadas confirmaram que estes fatores são significativos, porém as análises estatísticas indicaram que a umidade é fator que apresenta maior influência sobre a resposta FPase. A melhor condição obtida apresentou atividade de FPase de 1,85 U/gms, com 60% de CC e 70% de umidade inicial.

A comparação entre os cultivos com aeração forçada, utilizando colunas de Raimbault, e os cultivos com aeração natural, utilizando frascos, mostrou que a aeração é um fator importante para o crescimento celular e excreção de enzimas celulolíticas. Obteve-se atividade FPase máxima de 5,40 U/gms em FES com aeração forçada e IOC-4127, com 40% de FT e 60% de umidade inicial, o qual correspondeu a um aumento de 51,3% em relação ao cultivo com aeração natural.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização de outros planejamentos experimentais, empregando maiores valores de umidade inicial, o que foi indicado ser o fator de maior importância na produção de celulasas com CC;
- Averiguar a melhor taxa de aeração, o que não foi possível medir devido à falta de instrumentos;
- Realização de ensaios com microrganismos de outras espécies, isolados de regiões produtoras de cacau, para avaliar a capacidade de produção de celulasas em casca de cacau;
- Estudo da estabilidade das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 2012.

ALAM M.Z. *et al.* Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor, **Biochemical Engineering Journal**. 2009.

ALEMAWOR, F. *et al.* Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. **African Journal of Biotechnology**. v.9, p. 1950–1958. 2009.

ALMEIDA, M. C. de O. e. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Florianópolis – SC. 2012.

AMORIM, G. M. *et al.* Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.11, p. 34–41. 2017.

BAGEWADI, Z. B.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**. 2017.

BANSAL, N. *et al.* Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n. 7, p. 1341–1346. 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ªed. Campinas: Editora da Unicamp. 2001.

BEHERA, B. C. *et al.* Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.15, p.197–210, 2017.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals – a review. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 572–581, 2015.

BRITO, A. R. de. **Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim**. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA. 2015.

CARVALHO, I. Z. de; et al. Avaliação da casca de café como substrato produção de celulases por fermentação em estado sólido. In: **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia (CONTECC)**. 2018, Maceió, Alagoas.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. In: **European Biomass Conference and Exhibition**, 21, 2013, Copenhagen. Dinamarca.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto-SP. 2015.

CASTRO, A. M. de; et al. High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. **Enzyme Research**, v. 2010, n. ii, p. 1–8, 2010.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CAVALCANTI, E. D. C.; et al. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p.79-84, 2005.

CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. **Advanced Biochemical Engineering/ Biotechnology**. 65:69-92. 1999.

CEPLAC – Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira. Cacau: história e evolução. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em 24 abr. 2018.

CHANDRA, M. et al. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1659–1662, 2009.

COLEÇÃO DE CULTURAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS (CCFF) – INSTITUTO FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Diferenças entre as cepas disponíveis na CCFF**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <flavianeambrozim@gmail.com> em 27 mar. 2017.

CUESTA, S. M.; et al. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Journal** v.109, p. 1082-1086. 2015.

DESCHAMPS F et al. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. 1985.

DURAND, A. Bioreactor design for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p.113–125. 2003.

FANG, H.; XIA, L. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. **Bioresource Technology**. 2013.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FARINAS, C. S. *et al.* Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v.22. 2008.

FARINAS, C. S. *et al.* Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops & Products**, v. 34, p. 1186–1192, 2011.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico.** Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de São Carlos. Araras-SP. 2016.

FREIRE, *et al.* **Aproveitamento de resíduos e subprodutos da pós-colheita do cacau.** In: 53ª reunião dos países produtores de cacau, Ilhéus-BA. 1990.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, 1987.

HAQ, I *et al.* Solid-state fermentation of cellulases by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agricultural byproducts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.9, p. 1779-1782, 2006.

HIDENO, A. *et al.* Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 162–168. 2011.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

HU, Y. *et al.* Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p.133–142, 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (dezembro, 2018)**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

IDRIS, A. S. O. *et al.* Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265–271, 2017.

JUTURU V., WU J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KILIKIAN, B. V. *et al.* Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.45, n.1, p. 279–296. 2014.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems—An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1–2, p. 1–30. 2005.

KUHAD, R. C. *et al.* Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUPISK, L. **Produção de celulases a partir de resíduo da indústria arrozeira empregando *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei***. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola De Química e Alimentos– Universidade Federal Do Rio Grande- FURG, Rio Grande-RS. 2012.

LEE, H. *et al.* Utilization of agricultural residues for enhancement of cellulolytic enzyme production and enzymatic saccharification by *Trichoderma harzianum* KUC1716. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 185–191, 2017.

LEITE, L. R. C. Estudo de Competitividade do Cacau e Chocolate no Brasil: Desafios na Produção e Comércio Global. **Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços – MDIC**. Brasília. 2018.

LIBARDI, N. *et al.* Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 190–199, 2017.

LIU, D. *et al.* Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011.

LIU, J.; YANG, J. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3. 4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 420–425, 2007.

LIU, Y-T. *et al.* Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New Biotechnology**. v. 28, n. 6. 2011.

LYND, L. R. *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MANDAL, M.; GOSH, U. Application of statistical tool for optimization of physical parameters for cellulase production under solid state fermentation. **Indian Journal of Biotechnology**, v.17, p. 441-447. 2018.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL *et al.* **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington: ACS. v. 566., p. 292–324, 1994.

MÉLO, B. C. A. de. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia sp.*) utilizando *Trichoderma reesei***. 116p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC. 2016.

MERCADO DO CACAU. História do cacau. Disponível em <<http://mercadodocacau.com/cacau>>. Acesso em 29 abr. 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OBEROI, H. S. *et al.* Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. **Food Bioprocess Technology**, 2008.
- OLIVEIRA, J. de; *et al.* Gibberellic Acid Production by Different Fermentation Systems Using Citric Pulp as Substrate/Support. **BioMed Research International**, 2017.
- OLIVEIRA, S. D. *et al.* Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on semi-solid fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 937–944. 2018
- OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. de. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. 2014.
- OOIJKAAS, L. P. *et al.* Defined media and inert supports: Their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 356–360, 2000.
- PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.
- PAYNE, C. M. *et al.* Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1308–1448, 2015.
- PINHEIRO, I. R. **Estudo da influência das condições de cultivo de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 na produção do antibiótico retamicina**. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-SP. 2003.
- PIROTA, R. D. P. B.; *et al.* Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 01, p. 21 – 31. 2016.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**.v. 9, p.199–209. 1980.
- RAIMBAULT, M.; GERMON, J. C. **Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides**. French Patent 76-06-677, 1976.
- RAHNAMA, N. *et al.* Production and characterisation of cellulase from solid state fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* SNRS3. **Pertanika Journal. Tropical. Agriculture. Science**, v. 39, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; *et al.* Optimization of Tannase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Packed-Bed Bioreactor. **Journal of Microbiology and. Biotechnology**, v. 21, p. 960-967, 2011.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Enzymes in Lignocellulosic Biomass Conversion. In: SAHA, B. C. *et al.* **Fuels and Chemicals from Biomass**. Washington: American Chemical Society. p. 46–56. 1997.

SAINI, R. *et al.* Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 240–246. 2015.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 82f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus-ES, 2017.

SANTOS, T. C. dos *et al.* Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011.

SANTOS, T. C. dos *et al.* *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo-SP. v. 80, n.1, p 65–71. 2013a.

SANTOS, T. C. *et al.* Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. **Scientia Agraria Paranaensis**.v. 12, n. 2, p. 115–123. 2013b.

SCHOLL, A. L. *et al.* Elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 280–291, 2015.

SENADO. Produtores reivindicam percentual obrigatório de cacau em chocolate nacional. Disponível em: <<https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2018/03/21/produtores-reivindicam-percentual-obrigatorio-de-cacau-em-chocolate-nacional>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

SHARMA, A. *et al.* Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Nova Iorque: 2016.

SILVA NETO, P. J. *et al.* **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, CEPLAC, 2001.

SILVA, R. de O. **Estudo do reaproveitamento dos resíduos sólidos da indústria cacaueira**. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. 2018.

SILVINSKI, C. T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 144p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 2012.

- SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**. v.1, n. 1, p. 52–71. 2017.
- STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Review Genetics**, v. 9, 2008.
- SRIVASTAVA, N. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386. 2018.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.
- URBÁNSZKI K, SZAKACS G, TENGERTY RP. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology. Letters**, v. 22. 2000.
- VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 88, 2013.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (editors). **Advances in solid state fermentation**. Kluwer Academic: Dordrecht, 1997.
- VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation. **Mycobiology**. v. 39, n. 1, p. 20–25, 2011.
- WANG, Z. *et al.* High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 673–680, 2014.
- WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulytic complex in insects. **Annual Review of Entomology**. v. 55, p. 609–632. 2010.
- ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In: YANG, S.-T.; EL-ENSHASY, H.; THONGCHUL, N. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. 1^a ed. John Wiley & Sons, p. 131–146. 2013.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.
- ZHANG, Y. H. P; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. In: MIELEZ, J. R. Biofuels: **Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. v. 851, p. 213 - 231 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo apresentado na modalidade pôster no XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química.

ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DA CASCA DE CACAU NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES COM *T. harzianum*

AMBROZIM FM¹, FERREIRA INT¹, DUTRA JCS¹, SILVA WB¹, PINHEIRO IR¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

E-mail para contato: flavianeambrozim@gmail.com

RESUMO – *As celulasas são enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose, o principal constituinte da parede celular dos vegetais, em glicose. A fermentação em estado sólido (FES) pode ser empregada para produção de celulasas utilizando resíduos agroindustriais e fungos filamentosos. Neste trabalho, foram realizados cultivos sólidos para investigar a produção de celulasas utilizando casca de cacau como substrato e os fungos **Trichoderma harzianum** IOC-3844 e IOC-4127. Foram analisadas as atividades enzimáticas FPase e CMCase em função dos tempos de cultivo e de extração. Os resultados demonstraram a viabilidade desse processo, em que a linhagem IOC-4127 apresentou as maiores atividades de CMCase ($9,23 \pm 3,04$ U/g) e FPase ($1,63 \pm 0,16$ U/g), ambos no quarto dia de cultivo e 60 minutos de extração.*

1. INTRODUÇÃO

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a molécula de celulose, polímero fibroso, resistente e insolúvel à água e principal constituinte da parede celular dos vegetais. A reação de hidrólise libera as subunidades de glicose constituintes desse polímero, que são muito visadas devido à possível aplicação na produção de biocombustíveis (Castro; Pereira Jr, 2010).

Uma das estratégias para produção das celulasas é a fermentação em estado sólido (FES), em que uma de suas vantagens é a semelhança entre o ambiente fermentativo e o *habitat* natural dos fungos filamentosos, principais produtores dessas enzimas. (Pandey, 2003). Nesse processo, é possível reaproveitar resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento microbiano e a produção de celulasas. Farinas *et al.* (2008) constataram a viabilidade de produção de celulasas com *A. niger* em diferentes resíduos, obtendo 12,76 UI/g de CMCase em bagaço de laranja e 6,65 FPU/g em farelo de soja.

A cadeia produtiva da indústria cacaueteira gera uma grande quantidade de resíduo vegetal, principalmente proveniente da casca do fruto, que representa cerca de 80% da sua massa. Em 2017, o Brasil produziu mais de 214 mil toneladas de amêndoas de cacau (IBGE), parte de fruto que corresponde a 8% da sua massa, gerando, assim, mais de 2,1 milhões de toneladas de resíduos. Normalmente, esse material é reaproveitado para ração animal e compostagem, porém alguns componentes da casca do fruto podem ser tóxicos para animais e ocasionar a disseminação de pragas nas lavouras (Silva Neto *et al.*, 2001), o que ratifica a necessidade da busca por alternativas para o reaproveitamento desse resíduo.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de reaproveitar resíduos do cacau como substrato para a produção de celulasas por FES, utilizando fungos filamentosos da espécie *Trichoderma harzianum*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os fungos filamentosos *T. harzianum*, linhagens IOC 3844 e IOC 4127 foram obtidos liofilizados da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/ CCFF-RJ). Os microrganismos foram reidratados, inoculados em meio PDA (39 g/L) e incubados a

30 °C por 7 dias. O estoque foi obtido pelo cultivo em meio sólido contendo 80% de bagaço de cana (BC) e 20% de farelo de trigo (FT).

2.2. Cultivos Sólidos

O meio sólido consistiu de uma mistura composta por casca de cacau (CC), cedida pela Agroindústria Chocolates Espírito Santo (Rio Novo do Sul-ES) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), fornecido pela Usina Paineiras (Itapemirim-ES). Ambos foram submetidos à secagem em estufa a 105 °C, triturados em moinho de facas e peneirados para obtenção da granulometria desejada (inferior a 10 mesh).

As fermentações foram realizadas em frascos (Erlenmeyers) de 500 mL com 10 g de material sólido, na proporção 40:60 (CC:BC), com 60% de umidade inicial, obtida pela adição de solução salina (Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, 2000), e 0,1 g de inóculo, proveniente do estoque. Os frascos foram incubados a 30 °C durante 5 dias, sendo retirada uma amostra a cada 24 horas para realização da extração de enzimas e análises de atividades enzimáticas CMCase e FPase. Os cultivos foram realizados em duplicata.

2.3. Ensaio de extração e atividade enzimática

As extrações foram realizadas com 1,0 g do sólido fermentado, 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M e pH 4,8), 10 mL de água destilada e uma gota de Tween 80. A mistura foi agitada a 180 rpm e temperatura ambiente durante 20, 40 e 60 minutos. O extrato enzimático foi filtrado em gaze e centrifugado a 3500 rpm por 30 minutos.

A determinação das atividades enzimáticas CMCase e FPase foi baseada em Ghose (1987) e são expressas em U/g, que corresponde à quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por minuto na reação de hidrólise do substrato por grama de massa seca.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a atividade CMCase, a linhagem IOC-4127 apresentou a maior atividade entre os dois microrganismos, exibindo um comportamento semelhante entre 20 e 60 minutos de extração e uma tendência linear para 40 minutos. A maior atividade enzimática ocorreu no quarto dia de fermentação e realizando a extração em 60 minutos ($9,23 \pm 3,04$ U/g). Já a linhagem IOC-3844 apresentou comportamento semelhante na atividade em relação aos três tempos de extração, sendo no terceiro dia e em 20 minutos de extração a maior atividade ($4,95 \pm 0,78$ U/g). A Figura 1 apresenta os resultados médios obtidos nos experimentos.

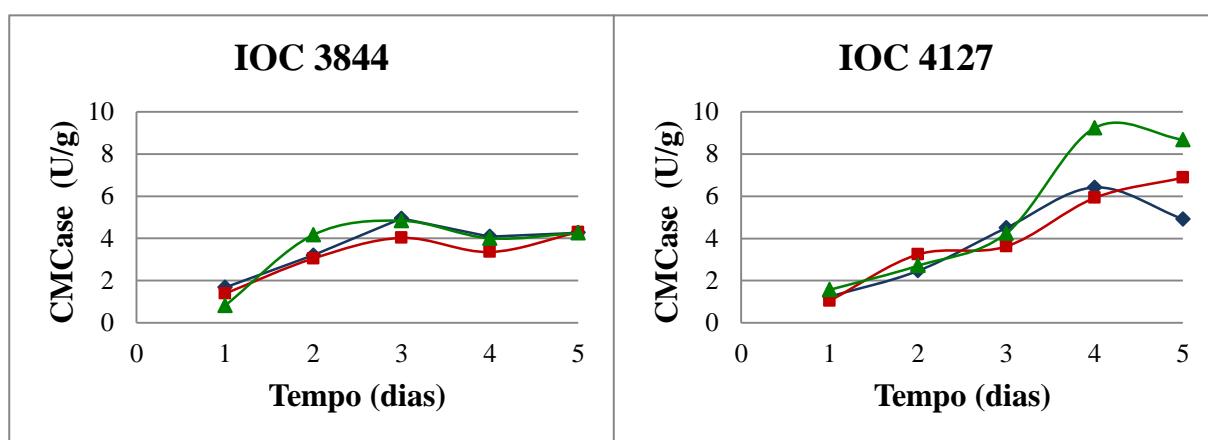


Figura 27 – Atividades enzimáticas CMCase para os fungos *Trichoderma harzianum* nos tempos de 20 (♦), 40 (■) e 60 (▲) minutos.

Para a atividade FPase, a linhagem IOC-4127 também apresentou maiores valores de atividade enzimática, no quarto dia de cultivo e 60 minutos de extração ($1,63 \pm 0,16$ U/g), apresentando o mesmo comportamento entre os três tempos de extração. A linhagem IOC-3844 apresentou a mesma tendência entre os tempos de extração estudados, sendo a maior atividade obtida a 60 minutos de extração e no segundo dia de cultivo ($0,84 \pm 0,15$ U/g). A Figura 2 esboça a média obtida nas duplicatas da atividade total de celulasas, FPase, para as duas linhagens de *T. harzianum*.

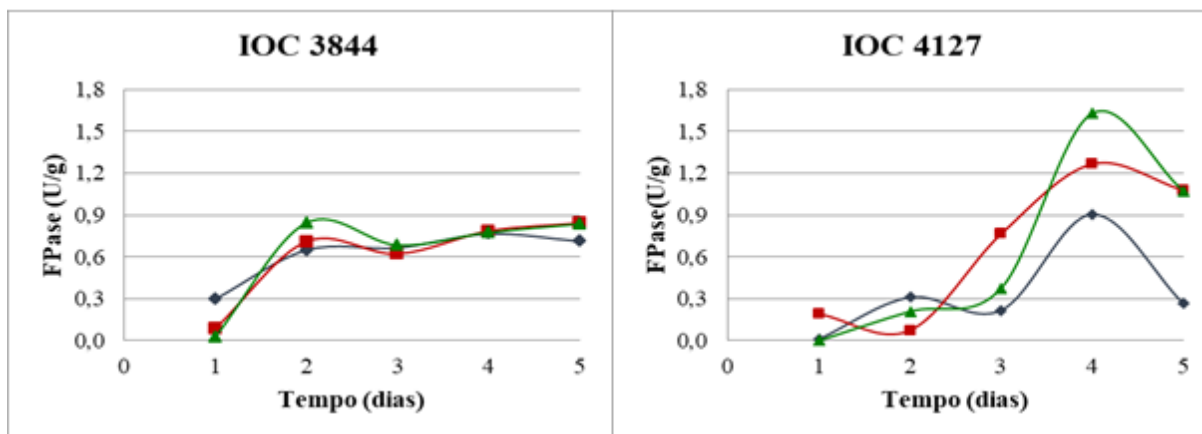


Figura 28 – Atividades enzimáticas FPase para os fungos *Trichoderma harzianum* nos tempos de 20 (◆), 40 (■) e 60 (▲) minutos.

Deschamps *et al.* (1985) alcançaram atividades de 18 FPU/g e 198 U/g de FPase e CMCase respectivamente, em cultivos com BC; Alam *et al.* (2009) produziram celulasas com *T. harzianum* em resíduos da produção de óleo de palma e atingiram 8,2 FPA/g de atividade FPase; Kilikian *et al.* (2014) obtiveram 5,4 U/g de atividade FPase para cultivo em BC; Rahnama *et al.* (2016) encontraram FPase de 6,25 U/g de substrato e CMCase de 111,31 U/g de substrato, utilizando palha de arroz.

Embora o presente estudo tenha obtido atividades enzimáticas inferiores às encontradas na literatura, vale ressaltar que o uso de resíduos de cacau para a produção de celulasas não é encontrado. Dessa forma, um dos aspectos relevantes dos resultados apresentados consiste na escassez de publicações sobre o objetivo proposto e a realização de outros experimentos visando determinar a condição ótima do processo.

4. CONCLUSÃO

Os cultivos sólidos para a produção de celulasas apresentaram resultados satisfatórios, o que torna a casca de cacau um resíduo em potencial para o uso em FES. Os fungos *T. harzianum* IOC-3844 e IOC-4127 se mostraram capazes de produzir as enzimas, sendo que os melhores resultados foram os da linhagem IOC-4127: CMCase $9,23 \pm 3,04$ U/g e FPase $1,63 \pm 0,16$ FPU/g.

5. REFERÊNCIAS

ALAM MZ *et al.* Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 2009.

- CASTRO AM de, PEREIRA Jr N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1. 2010.
- DESCHAMPS F *et al.* Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1985.
- FARINAS CS *et al.* Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. *Bol. Pesq. e Desenv.* Embrapa Instrumentação Agropecuária, v.22, p. 13. 2008.
- GHOSE TK. Measurement of cellulase activities. *Pure App. Chem.*, v. 59, n. 2, 1987.
- IBGE. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Disponível em:<www.ibge.gov.br>. Acesso em 18 mar 2018.
- KILIKIAN BV *et al.* Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. *Braz J Microbiol.* 2014.
- PANDEY A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* v. 13, n. 2–3. 2003.
- RAHNAMA N *et al.* Production and characterisation of cellulase from solid state fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* SNRS3. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 39 (4). 2016.
- SILVA NETO PJ *et al.* Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. Belém: CEPLAC, 2001.
- URBÁNSZKI K, SZAKACS G, TENGEDY RP. Standardization of the filter paper activity assay for solid sbubstrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22. 2000.

APÊNDICE B – Artigo apresentado na modalidade oral no XXI Encontro
Nacional de Modelagem Computacional

**ESTIMAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES**

Flaviane Mendonça Ambrozim¹ – flavianeambrozim@gmail.com

Wellington Betencurte da Silva¹ – wellingtonuff@yahoo.com.br

Julio Cesar Sampaio Dutra¹ – juliosdutra@yahoo.com.br

Iara Rebouças Pinheiro¹ – iararp.ufes@gmail.com.br

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre - Alegre, ES, Brasil

Resumo. O conhecimento da cinética dos processos fermentativos é essencial para avaliar as condições operacionais e a possível ampliação de escala. Os modelos cinéticos descrevem o comportamento da concentração celular em relação às demais variáveis do ambiente, ao longo do tempo de cultivo. Uma vez que a quantificação direta da biomassa é complexa, faz-se a estimação dessa variável a partir de uma medida indireta. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a estimativa do crescimento celular de *Trichoderma harzianum* em fermentação sólida a partir de medidas de produção de CO₂ e de atividade enzimática FPase e realizar a estimação de parâmetros dos modelos. Os resultados obtidos para a concentração de biomassa foram considerados satisfatórios, sendo o valor máximo de 0,0247 g cel/ gms alcançado com 24 horas de fermentação, próximo aos relatados na literatura.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, Celulases, Modelagem, Medida Indireta de Biomassa, Estimação de Parâmetros.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas celulolíticas são biocatalisadores extremamente visados por diversos segmentos da indústria, devido a sua atuação na molécula de celulose, polímero fibroso, resistente e insolúvel à água e principal constituinte da parede celular dos vegetais. A celulose é constituída por 3.500 a 10.000 unidades de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, em que cada molécula de glicose se liga à outra com orientação de 180° (NELSON; COX, 2014; STICKLEN, 2008).

A produção de celulasas por fermentação em estado sólido (FES) apresenta inúmeras vantagens em relação à fermentação submersa (FS), dentre as quais o baixo investimento, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e o baixo consumo de água e, conseqüentemente, baixa geração de efluentes. No entanto, a natureza heterogênea do meio de cultivo nesse tipo de fermentação dificulta a quantificação direta das variáveis do processo, bem como seu controle e monitoramento.

Dentre as variáveis de interesse, tem-se a concentração de biomassa, que consiste de uma medida indispensável para a verificação das condições ótimas de fermentação, bem como uma possível ampliação de escala. Contudo, a medida direta dessa grandeza é complexa em processos de FES, devido à dificuldade de separar os microrganismos do substrato e à interferência que este pode causar nos ensaios químicos (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997). Por isso, métodos indiretos relacionados aos componentes específicos de determinados microrganismos e às suas atividades metabólicas são frequentemente utilizados para estimar a biomassa, como medidas de ergosterol, glicosamina, enzimas e respiração celular (DALSETER, 2005; RUTSATZ, 2006).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a estimativa do crescimento microbiano a partir da modelagem de medidas indiretas de produção de gás carbônico e atividade enzimática em um processo de FES, bem como realizar a estimativa dos parâmetros envolvidos nos modelos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fermentação

Os experimentos de FES foram realizados em reatores tipo colunas de Raimbault (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980), as quais estavam conectadas a um sistema de aeração e em banho com temperatura de 30 °C durante 120 horas, conforme esquema da Figura 1.

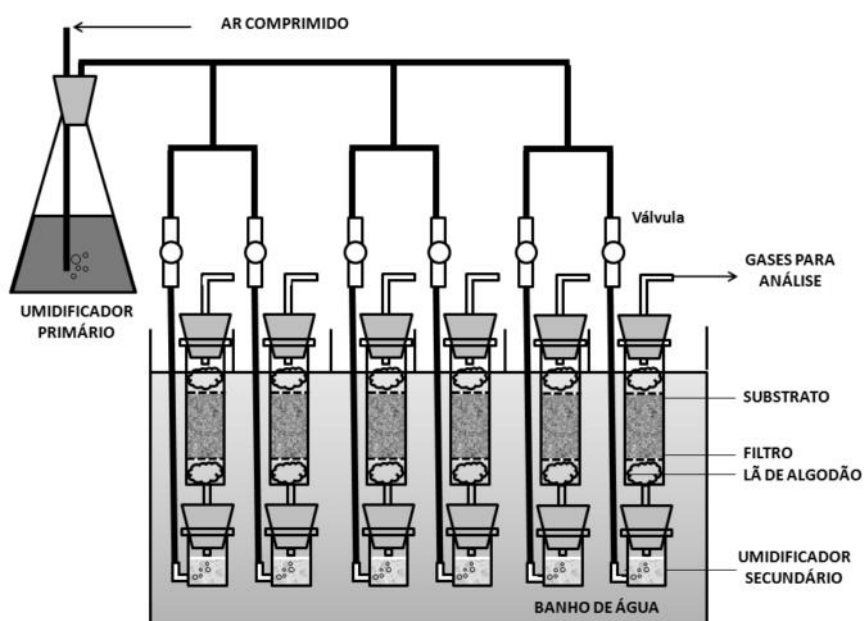


Figura 1 – Esquema do sistema de colunas de Raimbault.
Fonte: AFONSO (2012).

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* IOC-4127, obtido da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/ CCFF), localizada no Rio de Janeiro – RJ.

O meio sólido de fermentação era composto por 4 g, sendo 60% de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e 40% de farelo de trigo (FT). O teor de umidade inicial no meio sólido foi de 60%, calculado em base úmida, atingido pelo uso da solução salina descrita por Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, (2000).

As colunas e o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix Luferco AV-100) a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, cerca de 0,1 g de inóculo foi adicionado ao meio de cultivo, o qual foi homogeneizado e transferido para as colunas.

2.2 Medição de CO₂

O sistema de medição era um circuito fechado, composto por uma bomba peristáltica responsável por circular o ar a partir do topo da coluna, seguindo pelo sistema de medição de CO₂ e retorna à coluna pela sua parte inferior. As medidas de CO₂ liberado foram realizadas com um medidor portátil (AZ-77535), registrando-se os valores a cada minuto, durante o período de 30 minutos, nos tempos de fermentação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

2.3 Extração de enzimas

A cada 24 horas, aproximadamente 1,0 g do sólido fermentado foi adicionado em erlenmeyers de 125 mL, juntamente com 10 mL de água destilada e 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M e pH 4,8) mais uma gota de Tween 80. Os frascos foram submetidos à agitação de 180 rpm em mesa agitadora (SPLabor, 180/A) e temperatura ambiente por 60 minutos. Após o tempo de agitação, a mistura foi filtrada em gaze para remoção dos sólidos e o extrato enzimático foi centrifugado (Centrífuga Nova Instruments, NT 810) a 3500 rpm durante 30 minutos (SALOMÃO, 2017) e o sobrenadante utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

2.4 Determinação da atividade enzimática FPase

Para determinar a atividade enzimática de FPase empregou-se tiras de papel filtro Whatman nº1, com dimensões de 1,0 x 6,0 cm, (aproximadamente 50 mg)

como substrato e o teor de açúcares redutores foi determinado pelo método DNS (GHOSE, 1987).

A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio, nos quais foram adicionados o substrato enrolado e 1,5 mL do extrato enzimático, mantidos em banho-maria a 50 °C durante 60 minutos. Em seguida, 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado aos tubos de ensaio, que foram submetidos a banho de água fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo. O volume foi completado com água destilada até 10 mL, a mistura foi homogeneizada e sua absorbância lida em espectrofotômetro (Kasuki IL 227) com comprimento de onda ajustado em 540 nm (GHOSE, 1987).

Foram preparadas, ainda, as soluções de controle e para zerar o equipamento. Na primeira, realizou-se o mesmo procedimento, porém o extrato enzimático foi adicionado após decorrido o tempo da reação enzimática; para a segunda, substituiu-se o extrato enzimático por tampão citrato de sódio

2.5 Modelos Cinéticos

A taxa de produção de CO₂ (CER) foi calculada pela Equação 1 e, a partir do coeficiente respiratório (CR) definido pela Equação 2, obteve-se a taxa de consumo de oxigênio (OUR).

$$CER = \frac{1}{M} \frac{PV}{RT} \left(\frac{dz_{CO_2}}{dt} \right) \quad (1)$$

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (2)$$

Em que M é a massa seca instantânea; P é a pressão, R é a constante universal dos gases; T é a temperatura e z_{CO_2} é a fração molar de CO₂.

Foram utilizados os modelos cinéticos de consumo de oxigênio e de formação de produtos, correspondentes às Equações 3 e 4, respectivamente, para estimar a biomassa ao longo da fermentação.

$$OUR = \frac{1}{Y_{X/O_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{O_2} \cdot X \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_P \cdot X \quad (4)$$

Onde Y_{X/O_2} e $Y_{X/P}$ são os coeficientes de biomassa formada por O_2 consumido e produto formado, respectivamente; m_{O_2} e m_P são os coeficientes do consumo de O_2 e formação de produtos utilizados para a manutenção celular, respectivamente; X é a concentração microbiana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos cinéticos foram ajustados de forma direta pelo *software* Matlab e a ferramenta *ode23s*, utilizando os valores iniciais de 0,1 g cel/gms para X e 1×10^{-5} U/gms para a atividade enzimática de FPase. Com estes valores, o programa gerou a solução direta do problema e, posteriormente, foi realizada a otimização dos parâmetros, por meio do *software* Matlab usando a função *fmincon*.

Considerou-se que o coeficiente respiratório é igual a 1,0, o que significa que a taxa de oxigênio consumido utilizada pelos microrganismos para a respiração celular ao longo do cultivo é igual à taxa de gás carbônico produzida. Dessa maneira, pode-se assumir que $OUR = CER$, o que possibilita obter as medidas experimentais em relação ao O_2 .

Como resultados, tem-se a Figura 2, que apresenta a quantidade de biomassa fúngica estimada, em gramas de células por grama de massa seca (g cel/ gms) em função do tempo de fermentação.

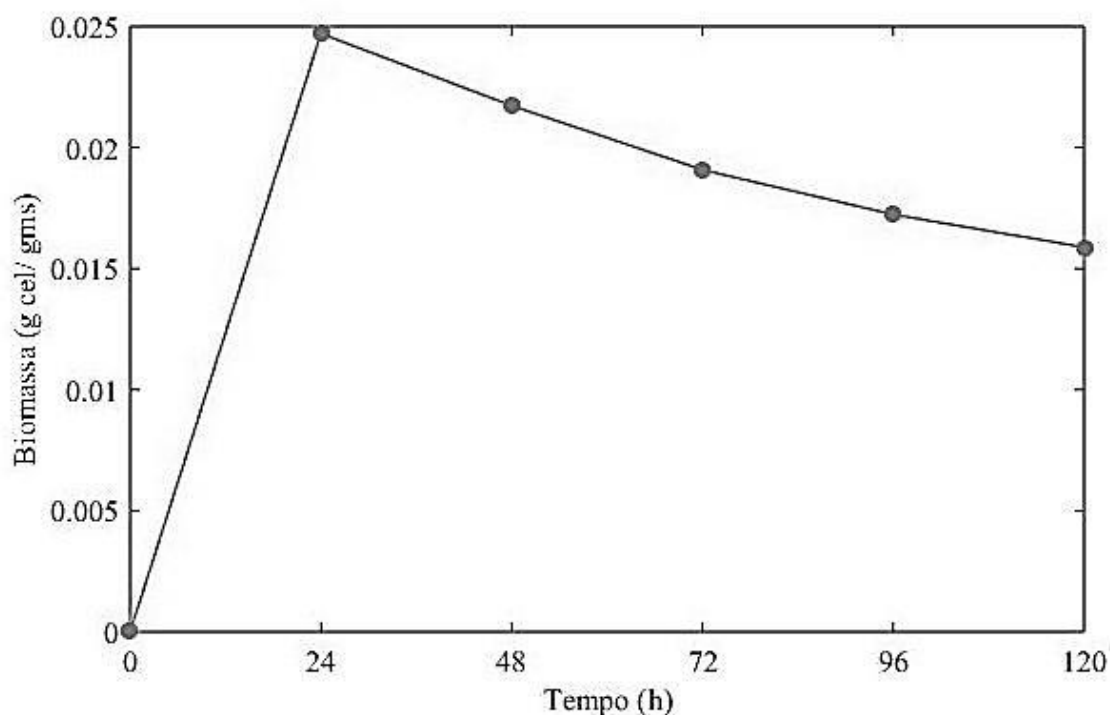


Figura 2 – Concentração estimada de células.

Observa-se que a concentração máxima de biomassa fúngica obtida foi de 0,0247 g cel/ gms com 24 horas de fermentação e após esse tempo, verifica-se uma redução de biomassa até o final do cultivo. Isso ocorre porque no início do cultivo ocorre a fase de crescimento exponencial (log), em que os microrganismos utilizam a maior parte dos nutrientes disponíveis para se multiplicarem.

Arora *et al.* (2018) estimaram o crescimento microbiano de *Rhizopus oryzae* MTCC 1987 em farelo de trigo e torta de óleo de linhaça para a produção de fitase, a partir de ensaios de glicosamina, e obtiveram concentração máxima de células de 71 g/kgms.

Trametes hirsuta foi cultivado em silagem de milho e madeira de pinho por Steudler e Bley (2015). O crescimento celular desse microrganismo foi estimado em relação à produção de gás carbônico e a concentração máxima obtida encontra-se próxima de 0,05 g/ gms.

A Figura 3 mostra a comparação entre os dados obtidos experimentalmente para a atividade enzimática de FPase e os dados simulados pelo modelo, em função do tempo de fermentação.

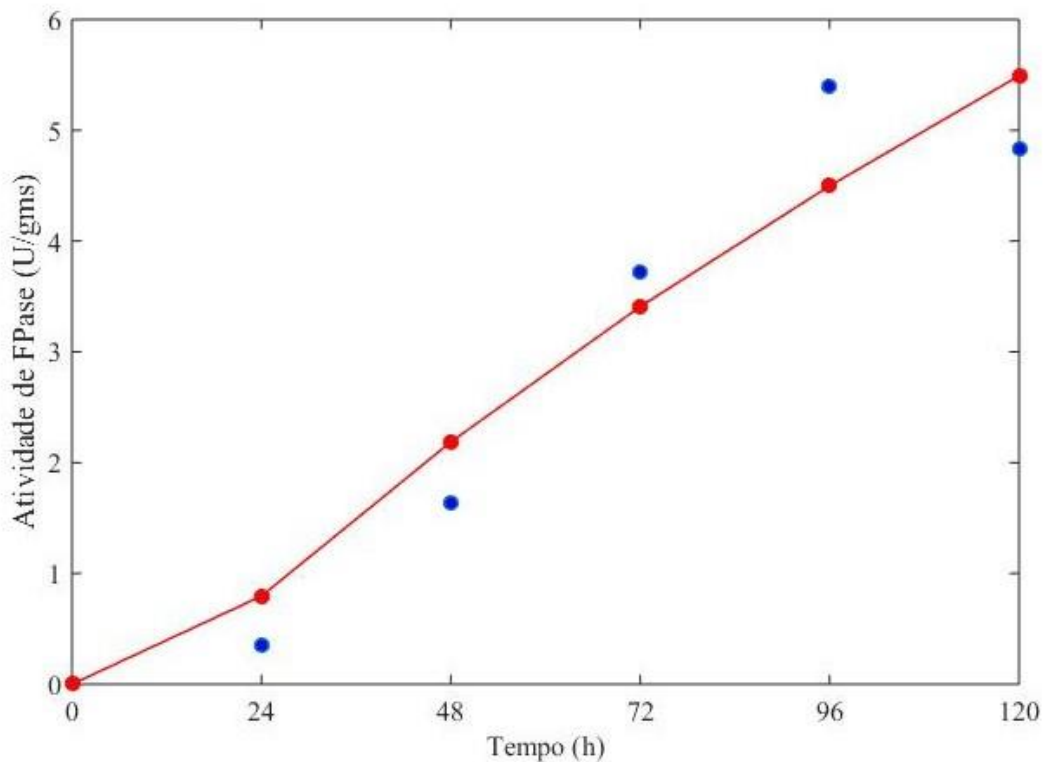


Figura 3 – Comparação entre os pontos experimentais (●) e preditos (●) para a atividade enzimática de FPase.

Verifica-se que os valores simulados representam suficientemente bem os pontos experimentais até 72 horas de fermentação. A partir de 96 horas, tem-se a atividade máxima seguida de redução característica, todavia os pontos simulados se mostraram discrepantes em relação aos pontos experimentais. É possível que o modelo empregado represente bem os pontos de aumento de atividade enzimática, mas não represente suficientemente bem quando essa atividade é reduzida, após um certo tempo de fermentação.

A otimização foi realizada pela minimização da função objetivo, que corresponde à diferença entre os pontos simulados e os pontos experimentais. Para ilustrar o comportamento dessa função, traçou-se o gráfico contendo os valores da função objetivo para cada iteração. A Figura 4 apresenta esse gráfico.

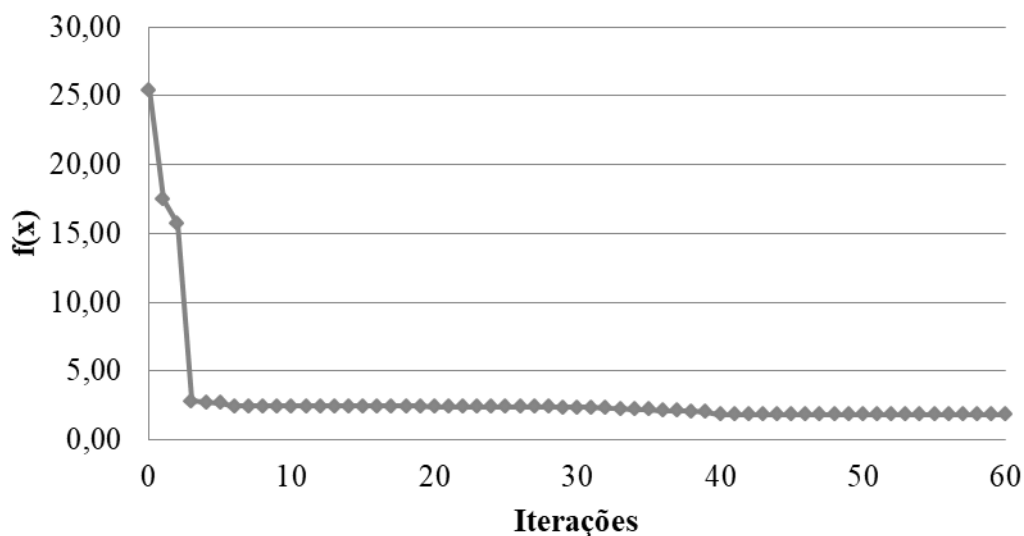


Figura 4 – Variação da função objetivo com o decorrer das iterações.

Observa-se que a redução mais significativa da função objetivo ocorre após as quatro primeiras iterações, o que evidencia a alta velocidade com que a função objetivo é minimizada.

Os valores estimados dos parâmetros e otimizados pelo *software* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros estimados e otimizados para os modelos cinéticos.

Parâmetro	Valor
Y_{X/O_2}	0,259 g cel/ mmol O_2
$Y_{X/P}$	$1,011 \times 10^{-5}$ g cel/ U
m_{O_2}	0,067 mmol O_2 / g cel · h
m_P	2,508 U/ gcel · h

Diferentes métodos de estimação de parâmetros têm sido abordados na literatura para os processos de FES (GELMI, PÉREZ-CORREA, AGOSIN, 2002; RUTSATZ, 2006; SILVEIRA, MAZUTTI, SALAU, 2014), contudo sua precisão é baixa, uma vez que se pode atingir um ótimo local, e um esforço computacional

considerável é requerido. A utilização de uma ferramenta para estimação de parâmetros que seja mais robusta e rápida proporciona a determinação mais eficiente da concentração de biomassa, tornando possível o monitoramento online do processo.

4. CONCLUSÃO

Baseando-se nas análises apresentadas, pode-se concluir que foi possível realizar a estimativa do crescimento microbiano no cultivo sólido de *T. harzianum* para a produção de celulases a partir de medidas indiretas da respiração celular e da atividade enzimática. Bem como, a estimação de parâmetros é uma ferramenta muito útil em fermentações em larga escala por promover de modo rápido e eficaz a otimização do processo.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 2012.
- ARORA, S. *et al.* Oxygen uptake rate as a tool for on-line estimation of cell biomass and bed temperature in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlim. 2018.
- DALSENTER, F. D. H. DA. Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido. 2005.
- GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry** v.37, p.1033–1040. 2002
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, 1987
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**.v. 9, p.199–209. 1980.
- RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2006.

- SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 82f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus-ES, 2017.
- SILVEIRA, C. L. da; MAZUTTI, M. A.; SALAU, N. P. G. Modelling the microbial growth and temperature profile in a fixed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2014.
- STEUDLER, S.; BLEY, T. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlim. 2015.
- STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Review Genetics**, v. 9, 2008.
- URBÁNSZKI K, SZAKACS G, TENDERDY RP. Standardization of the filter paper activity assay for solid sbubstrate fermentation. **Biotechnology. Letters**, v. 22. 2000.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (editors). **Advances in solid state fermentation**. Kluwer Academic: Dordrecht, 1997.

APÊNDICE C – Resultados dos teores de umidade e das atividades enzimáticas dos experimentos realizados.

Tabela 12 – Teor de umidade e FPase obtidos para os experimentos do planejamento experimental com biomassa de cacau.

Experimento	CC:BC	Umidade inicial (%)	Tempo de fermentação (h)	Umidade (%)	FPase (U/gms)
1	40:60	50	24	56,80	0,46
			48	56,46	0,00
			72	55,32	0,00
			96	54,86	0,00
			120	53,82	0,52
2	60:40	50	24	56,72	0,06
			48	56,20	0,00
			72	54,94	0,00
			96	51,85	0,00
			120	49,99	0,63
3	50:50	50	24	54,23	0,54
			48	53,58	0,25
			72	53,70	0,00
			96	52,81	0,06
			120	54,62	0,19
4	40:60	70	24	72,20	0,06
			48	72,90	0,40
			72	72,15	0,59
			96	73,27	0,30
			120	75,37	0,92
5	60:40	70	24	69,85	0,11
			48	71,53	0,00
			72	71,37	0,22
			96	72,73	1,30
			120	72,79	1,85

(continuação)

6	50:50	70	24	70,62	0,00
			48	70,28	0,05
			72	69,81	0,93
			96	71,50	1,28
			120	72,03	1,62
7	40:60	60	24	60,93	0,00
			48	60,72	0,21
			72	60,08	0,38
			96	60,05	1,63
			120	59,69	1,07
8	60:40	60	24	63,14	0,09
			48	62,90	0,00
			72	63,48	0,00
			96	63,63	0,48
			120	63,92	0,74
9	50:50	60	24	63,00	0,00
			48	63,03	0,26
			72	63,35	0,00
			96	63,73	0,72
			120	64,08	0,47
10	50:50	60	24	59,41	0,88
			48	59,41	0,03
			72	61,40	0,56
			96	58,33	0,30
			120	62,01	0,61
11	50:50	60	24	63,26	0,00
			48	63,60	1,08
			72	62,76	0,03
			96	63,92	2,26
			120	64,93	1,03

Tabela 13 - Teor de umidade e atividade FPase obtidos nos cultivos com aeração forçada para *T.harzianum* IOC-4127 e IOC-3844.

Linhagem	Tempo de fermentação (h)	Umidade (%)	FPase (U/gms)
IOC-4127	24	69,42	0,36
	48	72,07	1,64
	72	79,11	3,73
	96	81,72	5,40
	120	82,22	4,84
IOC-3844	24	56,66	0,45
	48	57,22	1,09
	72	62,34	3,46
	96	68,47	2,97
	120	66,37	3,19

Tabela 14 – Teor de umidade e atividade FPase obtidos nos cultivos com aeração natural para *T.harzianum* IOC-4127 e IOC-3844.

Linhagem	Tempo de fermentação (h)	Umidade (%)	FPase (U/gms)
IOC-4127	24	67,11	0,31
	48	70,23	2,76
	72	73,17	3,58
	96	72,33	3,50
	120	72,22	2,91
IOC-3844	24	66,67	0,25
	48	66,51	1,55
	72	66,46	2,26
	96	64,10	2,28
	120	63,72	2,54